

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**TESIS DOCTORAL**

**Modelos celulares de inmunodeficiencias congénitas de  
linfocitos T: aplicación a estudios de expresión y señalización**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Alejandro Briones Contreras**

**Directores**

**José R. Regueiro González-Barros**  
**Paula P. Cárdenas Mastrascusa**

**Madrid**

**© Alejandro Briones Contreras, 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Inmunología, oftalmología y ORL



**TESIS DOCTORAL**

Modelos celulares de inmunodeficiencias congénitas de linfocitos

T: aplicación a estudios de expresión y señalización

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Alejandro Briones Contreras**

Directores

José Ramón Regueiro González-Barros

Paula Patricia. Cárdenas Mastrascusa

**Madrid**

---



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**TESIS DOCTORAL**

**MODELOS CELULARES DE INMUNODEFICIENCIAS  
CONGÉNITAS DE LINFOCITOS T: APLICACIÓN A  
ESTUDIOS DE EXPRESIÓN Y SEÑALIZACIÓN**

**Alejandro Briones Contreras**

MADRID, 2019

Directores: Dr. José R. Regueiro González-Barros  
Dra. Paula P. Cárdenas Mastrascusa





UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Alejandro Biones Contreras,  
estudiante en el Programa de Doctorado Doctorado en Investigación Biomédica,  
de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

Modelos celulares de inmunodeficiencias congénitas de linfocitos T: aplicación a estudios de expresión y señalización

y dirigida por: José R. Regueiro González-Barros y Paula P. Cárdenas Mastrascusa

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 11 de septiembre de 2019

Fdo.:

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



## Índice

<b>1.- Resumen/Abstract</b>	1
1.1.-Resumen	3
1.2.-Abstract	7
<b>2.-Abreviaturas</b>	11
<b>3.-Introducción</b>	17
3.1.-El TCR	19
3.2.-Complejo CBM	21
3.2.1.-Activación y señalización del CBM en linfocitos T	22
3.3.-Inmunodeficiencias primarias	24
3.3.1.-Deficiencias del TCR (TCRID)	24
3.3.2.-Deficiencia de CD247	26
3.3.3.-Reversiones somáticas	28
3.3.4.-Defectos del CBM	32
<b>4.-Objetivos</b>	35
<b>5.-Material y métodos</b>	39
5.1.-Generación de plásmidos	43
5.2.-Líneas celulares y cultivos	47
5.3.-Citometría de flujo	48
5.4.-Estudios de activación	49
5.5.-Transfección	50
5.6.-Producción de partículas retrovirales	50
5.7.-Transducción retroviral	50
5.8.-CRISPR/Cas9	51
5.9.-Lisados celulares	52
5.10.-Western blot	53
5.11.-Análisis estadístico	54
<b>6.-Resultados</b>	55
6.1.-CD247	57
6.1.1.-Caracterización de las líneas humana (PM1T) y murina (MA5.8) deficientes en CD247	57
6.1.2.-Reconstitución de la expresión del TCR en las líneas deficientes en CD247 mediante transfección de CD247 WT	59
6.1.3.-Reconstitución comparativa de mutaciones somáticas vs. WT	60
6.1.4.-Ensayos de reconstitución del TCR mediante transducción retroviral	63
6.1.5.-Reconstitución de mutaciones en CD247 por transducción retroviral	65
6.1.6.-Generación de una línea T Jurkat deficiente de CD247	65
6.1.7.-Reconstitución del TCR con CD247 WT en la línea ZKO	68
6.1.8.-Estudio del efecto de mutaciones <i>nonsense</i> en CD247 sobre la expresión superficial del TCR	70
6.2.-Estudio del defecto de BCL10 en la activación del linfocito T	72
6.2.1.-Análisis de la línea HTLV-I deficiente para BCL10	72
6.2.2.-Generación de líneas T Jurkat heterocigotas y deficientes en BCL10	76
6.2.3.-Comparación de la afectación de la respuesta T a distintos niveles de expresión de BCL10	77
<b>7.-Discusión</b>	83
7.1.-Modelos celulares CD247 y el TCR	85



7.1.1.-Nuevos modelos celulares para el estudio del rol de CD247 en humanos.....	85
7.1.2.-Disparidad en la reconstitución de las reversiones somáticas.....	87
7.1.3.- Las mutaciones en CD247 Q70X y Q101X tienen un efecto dominantes negativo sobre el TCR.....	88
<b>7.2.-Papel de BCL10 en la función de los linfocitos T .....</b>	<b>91</b>
7.2.1.-Impacto de la deficiencia de BCL10 en la biología del linfocito T .....	91
7.2.2.-La reducción de los niveles de BCL10 por heterocigosis se comporta como una deficiencia completa.....	94
<b>8.-Conclusiones .....</b>	<b>97</b>
<b>9.-Bibliografía.....</b>	<b>101</b>
<b>10.-Anexos .....</b>	<b>111</b>
<b>10.1.-Curriculum vitae.....</b>	<b>113</b>
<b>10.2.-Publicaciones del autor relevantes para esta tesis.....</b>	<b>119</b>

---

## **1.- Resumen/Abstract**

---



## **1.1.-Resumen**

### **Introducción**

Los linfocitos T desempeñan uno de los papeles más cruciales en la respuesta inmunológica: la respuesta adaptativa. La activación del linfocito T a través de su receptor, el TCR, desencadena una extensa red de señalización con decenas de proteínas intermediarias diferentes para generar respuestas efectoras adecuadas. El TCR es un complejo octamérico constituido por diferentes cadenas entre las que se encuentra CD247. La ausencia de cualquiera de los componentes del TCR se traduce en un defecto de desarrollo o función de los linfocitos T causante de SCID. Además, en los casos de deficiencias de CD247 se han descrito mutaciones somáticas minoritarias que son capaces de restaurar el defecto de expresión del TCR.

El complejo CBM (CARD11-BCL10-MALT1) forma parte la ruta de señalización dependiente del TCR. Mutaciones en cualquiera de estos 3 genes se han reportado como causantes de SCID.

### **Objetivos**

En este trabajo nos proponemos diseñar modelos celulares de inmunodeficiencias humanas originadas por la deficiencia de la cadena CD247 del TCR y de la molécula de señalización intracelular BCL10.

Para ello, en la deficiencia de *CD247* el objetivo es desarrollar un sistema que nos permita evaluar el impacto de las mutaciones en esta cadena sobre la expresión y funcionalidad del TCR mediante el uso de nuevas líneas celulares deficientes para CD247 y optimización de sistemas de transfección para introducir diferentes variantes del gen para estudiar su capacidad de reconstitución del TCR.

Así mismo, se pretende estudiar el efecto de la deficiencia de BCL10 en la biología de los linfocitos T mediante una línea T humana deficiente en BCL10 y,

también, generar mediante edición génica líneas deficientes y heterocigotas para dilucidar si la heterocigosis de BCL10 se puede catalogar como haploinsuficiencia.

## **Resultados y discusión**

Utilizamos una línea humana CD247 deficiente, PM1T, para hacer ensayos de reconstitución de la expresión de CD3 por transfección de diferentes variantes de CD247 (WT, Q70X, Q70W, Q70L, Q70Y). La línea PM1T reconstituyó con CD247 WT de manera menos eficiente el TCR que su línea homóloga de ratón MA5.8. La transfección de la mutación germinal Q70X, no indujo sobreexpresión de CD3 en la línea PM1T, pero sí en la línea de ratón. Al transfectar las mutaciones somáticas Q70L, Q70W y Q70Y, vimos que, aunque todas son mutaciones revertientes, no reconstituyen al mismo nivel, presentando Q70Y los valores más bajos. Debido a las dificultades para transfectar en HTLV-I, también se hicieron estos experimentos por transducción retroviral, que mejoraron la reconstitución del TCR, aunque con una eficiencia más baja, ya que las líneas inmortalizadas con HTLV-I son difíciles de infectar con otros virus.

Mediante CRISPR/Cas9 generamos una línea Jurkat deficiente para CD247 (ZKO). En esta línea los experimentos de reconstitución aumentaron su eficacia y permitieron ver que con la restauración de CD247 también se restaura la función del TCR. La reconstitución del TCR de las mutaciones somáticas fue menor en este modelo respecto a la proteína WT. La transfección en Jurkat ZKO y control nos permitió evaluar el efecto dominante negativo que pueden generar las mutaciones que eliminan la región citosólica de CD247, como ya vimos con Q70X. A partir de un nuevo caso con la mutación Q101X en CD247, vimos que el efecto dominante negativo se repetía, aunque menos acusado. Esto sugiere una correlación entre este efecto y la longitud de cadena que se pierda.

A partir de una línea T BCL10 deficiente HTLV-I, generada a partir del único paciente descrito con defecto completo de esta proteína, pudimos comprobar que las respuestas inductoras a la estimulación del TCR mediadas por el CBM

estaban afectadas. Los marcadores de activación ICOS y CD25 y el factor de transcripción IRF4 no eran inducibles al activar la ruta del TCR. La producción de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-2 y TNF $\alpha$  estaba reducida sustancial pero no completamente, lo que sugiere que el complejo CBM, si bien induce o regula su producción, no lo hace en exclusiva.

Generamos por edición genética mediante la tecnología CRISPR/Cas9 dos líneas T derivadas de células Jurkat: una completamente deficiente para BCL10 y otra heterocigota con niveles de expresión reducidos a la mitad. Estas líneas confirmaron los datos obtenidos en las células HTLV-I derivadas del paciente.

La producción de IL-2 estaba completamente impedida en la línea deficiente y la inducción de CD25 estaba parcialmente afectada. También vimos que la actividad proteolítica del complejo CBM, medida por la degradación de Reg-1, también se encontraba afectada. Curiosamente, en la línea heterocigota se observó un fenotipo idéntico a la línea deficiente.

## **Conclusiones**

Al reproducir la línea PM1T la condición hallada en el paciente en el que se describió la mutación Q70X, cosa que no hacía el modelo anterior, consideramos más adecuado su uso como modelo.

Con nuestros datos podemos concluir que la región intracelular de CD247 en humanos y no en ratón es indispensable para la expresión del TCR en superficie, hallándose un efecto dominante negativo en aquellas mutaciones que acorten esa región. Las mutaciones somáticas descritas pueden revertir el defecto T, pero no todas con la misma eficiencia.

En cuanto a BCL10, nuestros experimentos han mostrado como la ausencia de esta proteína es crítica para gran parte de las respuestas efectoras del linfocito T, como la inducción de marcadores de activación CD25 e ICOS, la producción de las citoquinas IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  o el factor de transcripción IRF4, así como

de la actividad proteolítica de complejo, incapaz de degradar Regnasa 1 y a BCL10, ampliando la descripción que se realizó del paciente del que provenía la línea. Las líneas generadas deficientes y heterocigotos en BCL10 han permitido determinar que es necesaria una cantidad mínima de BCL10 para la señalización del CBM, y que por debajo de esa cantidad el complejo no se forma, generando un defecto similar al de la línea deficiente. Estos datos hacen plantear la idea de catalogar la deficiencia de BCL10 como autosómica dominante y considerarla como haploinsuficiencia.

## **1.2.-Abstract**

### **Introduction**

T-lymphocytes play one of the most crucial roles in the immune response: the adaptive response. The activation of the T lymphocyte through its receptor, the TCR, triggers an extensive signalling network with dozens of different intermediate proteins to generate adequate effector responses. TCR is an octameric complex made up of different chains, including CD247. The absence of any of the components of the TCR results in a defect in the development or function of the T lymphocytes causing SCID. In addition, in cases of CD247 deficiencies, minority somatic mutations have been described as capable of restoring the defect.

The CBM complex (CARD11-BCL10-MALT1) is part of the TCR-dependent signalling route. Mutations in any of these three genes have been reported to cause SCID.

### **Objectives**

In this work we propose to design cellular models of human immunodeficiencies originated by CD247 chain and the intracellular signalling molecule BCL10 deficiency within the TCR.

To this aim, in CD247 deficiency the objective is to develop a system that allows us to evaluate the impact of mutations in this chain on the expression and functionality of TCR through the use of new cell lines deficient for CD247 and optimization of transfection systems to introduce different variants of the gene to study its ability to reconstitute the TCR.

It is also intended to study the effect of BCL10 deficiency in the biology of T lymphocytes using a human T line deficient in BCL10 and also to generate deficient lines and heterozygots by means of gene editing to elucidate whether BCL10 heterozygosis can be catalogued as haploinsufficiency.



It is also intended to study the effect of BCL10 deficiency on the biology of T lymphocytes and, also, to analyse by gene editing whether BCL10 heterozygosis can be classified as haploinsufficiency.

## **Results and discussion**

We have used a deficient human CD247 line, PM1T, to perform reconstitution tests of CD3 expression by transfection of different variants of CD247 (WT, Q70X, Q70W, Q70L, Q70Y). The PM1T line reconstituted the TCR with CD247 in a less efficiently than its homologous line of mouse MA5.8. The transfection of the germinal mutation Q70X did not induce CD3 overexpression in the PM1T line, but it did induce CD3 overexpression in the mouse line. When transfecting the somatic mutations Q70L, Q70W and Q70Y, we noticed that, although all are revertant mutations, they do not reconstitute at the same level, with Q70Y showing the lowest values. Due to the difficulties of transfecting in HTLV-I, these experiments were also made by retroviral transduction, giving an increase in the expression of TCR, although a lower efficiency, since the immortalized lines with HTLV-I are difficult to infect with other viruses.

Through CRISPR/Cas9 we generated a deficient Jurkat line for CD247 (ZKO). In this line, the reconstitution experiments increased their efficiency and allowed us to see that, with the restoration of CD247, the function of the TCR is also restored. The reconstitution of the somatic mutations was lower in this model with respect to the WT protein. The transfection into Jurkat ZKO and control allowed us to better evaluate the negative dominant effect that the mutations which eliminate the cytosolic region of CD247 can generate, as we already saw with Q70X. From a new case with the Q101X mutation in CD247, we noticed that the negative dominant effect was repeated, although less pronounced. This suggests a correlation between this effect and the chain length lost.

From a HTLV-I deficient T BCL10 line, generated from the only patient described with a complete defect of this protein, we were able to verify that the

CBM-mediated inductive responses to CRT stimulation were affected. The activation markers ICOS and CD25 and the transcription factor IRF4 were not inducible when activating the TCR route. The production of the cytokines IFN $\gamma$ , IL-2 and TNF $\alpha$  was substantially but not completely reduced, suggesting that the CBM complex, while inducing or regulating its production, is not an exclusive function of this pathway.

Using CRISPR/Cas9 technology, we generate two T lines derived from Jurkat cells: one completely deficient for BCL10 and the other heterozygous with expression levels reduced by half. These lines confirmed the data obtained in HTLV-I cells derived from the patient.

IL-2 production was completely impeded in the deficient line, and CD25 induction was partially affected. We also saw that the proteolytic activity of the CBM complex, as measured by Reg-1 degradation, was also affected. Interestingly, an identical phenotype to the deficient line was observed in the heterozygous line. These data can be explained as a minimum requirement of BCL10 in order to initiate the MBC complex. These results would support an autosomal dominant inheritance model, which could facilitate the diagnosis of future patients.

## **Conclusions**

When reproducing the PM1T line the condition found in the patient in which the Q70X mutation was described, which was not the case with the previous model, we consider its use as a model to be more appropriate.

With our results, we can conclude that the intracellular region of CD247 in humans and not in mice is indispensable for the expression of the TCR in surface, being the mutations that shorten this region dominant negative. The somatic mutations described can reverse the T defect, but not all with the same efficiency.

As for BCL10, our experiments have shown how the absence of this protein is critical for much of the effector responses of T lymphocytes, such as induction of CD25 and ICOS activation markers, production of IL-2 cytokines, INF $\gamma$  and TNF $\alpha$  or IRF4 transcription factor, as well as proteolytic activity of complex, unable to degrade Regnase 1 and to BCL10, broadening the description made with the patient from whom the line came. The generated deficient and heterozygotic lines in BCL10 have allowed to determine that a minimum amount of BCL10 is necessary for MBC signaling, and that below that amount the complex is not formed, generating a defect similar to that of the deficient line. This data makes us reconsider the idea of classifying BCL10 deficiency as autosomal dominant and considering it as haploinsufficiency.

---

## **2.-Abreviaturas**

---



**Tabla 2.1. Abreviaturas utilizadas.**

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
<b>AD</b>	Autosómica dominante
<b>ADA</b>	<i>Adenosine deaminase</i>
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>APC</b>	<i>Antigen-presenting cell</i>
<b>APS</b>	Persulfato de amonio
<b>AR</b>	Autosómica recesiva
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Arp2/3</b>	Actin-related protein 2/3 complex
<b>ARPC1B</b>	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B</i>
<b>BCG</b>	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
<b>BCG-itis</b>	<i>BCG related local lymphadenitis</i>
<b>BM</b>	<i>Back mutation</i>
<b>CaMK</b>	Kinasa dependiente de Ca <sup>2+</sup>
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación ( <i>Cluster of differentiation</i> )
<b>CDM</b>	<i>Drosophila melanogaster myoblast city</i>
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i>
<b>CI</b>	control de isotipo
<b>CID</b>	Inmunodeficiencia combinada
<b>CML</b>	<i>Chronic Myeloid Leukemia</i>
<b>CXCR4</b>	<i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DC</b>	Células dendríticas ( <i>dendritic cells</i> )
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>DOCK8</b>	<i>Dedicator of cytokinesis 8</i>
<b>EBV</b>	<i>Epstein-Barr virus</i>
<b>ERK</b>	<i>Extracellular signal-Regulated protein</i>
<b>FACS</b>	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>fetal bovine serum</i> )
<b>gDNA</b>	<i>Genomic DNA</i>
<b>Geo-MFI</b>	Media geométrica de la intensidad de fluorescencia
<b>GFP</b>	<i>Green fluorescent protein</i>
<b>HIES</b>	Síndrome de Hiper IgE
<b>HSC</b>	<i>Hematopoietic stem cell</i>
<b>HSCT</b>	<i>Hematopoietic stem cell transplantation</i>
<b>HSV</b>	<i>Herpes Simplex virus</i>
<b>HTLV-I</b>	<i>Human T cell lymphotropic virus type 1</i>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	$\gamma$ Interferon
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math></b>	<i>NF-<math>\kappa</math>B inhibitor <math>\alpha</math></i>
<b>IKK</b>	<i>Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase</i>
<b>IL</b>	Interleuquina
<b>IP3 Inositol</b>	(1,4,5)-triphosphate
<b>IRF</b>	<i>Interferon regulatory factor</i>

Abreviatura	Significado
<b>ITAM</b>	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif</i>
<b>JAK</b>	<i>Janus kinase</i>
<b>JNK</b>	<i>c-Jun amino-terminal Kinase</i>
<b>kDa</b>	kilo Dalton
<b>LAD</b>	<i>Leukocyte adhesion deficiency.</i>
<b>LAT</b>	<i>T Linker for Activation of T cells</i>
<b>Lck</b>	<i>Lymphocyte-specific protein tyrosine Kinase</i>
<b>LOF</b>	<i>Loss-of-function</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>mRNA</b>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<b>MW</b>	<i>Molecular weight</i>
<b>MWM</b>	<i>Molecular weigh Marker</i>
<b>MYSM1</b>	<i>Myb Like, SWIRM And MPN Domains 1</i>
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NE</b>	No estimulado
<b>NFAT</b>	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i>
<b>NF-<math>\kappa</math>-B</b>	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
<b>NGS</b>	<i>Next generation sequencing</i>
<b>NHEJ</b>	<i>Nonhomologous end-joining</i>
<b>NK</b>	<i>Natural Killer</i>
<b>NT</b>	<i>No transfected</i>
<b>O/N</b>	<i>Overnight</i>
<b>PAMPs</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern molecules</i>
<b>PBL</b>	<i>Peripheral blood lymphocytes</i>
<b>PBMC</b>	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
<b>PC</b>	<i>Plasmatic cell</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i>
<b>PHA-L</b>	leucoaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
<b>PI3K</b>	<i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
<b>PID</b>	<i>Primary immunodeficiency</i>
<b>PIP3</b>	<i>Phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate</i>
<b>PKC<math>\theta</math></b>	<i>Protein Kinase C <math>\theta</math></i>
<b>PLC<math>\gamma</math>-1</b>	<i>Phospholipase C<math>\gamma</math>-1</i>
<b>PLD1</b>	<i>Phospholipase D1</i>
<b>PMA</b>	<i>Phorbol myristate acetate</i>
<b>PMSF</b>	<i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative PCR</i>
<b>RAG1</b>	<i>Recombination activating gene</i>
<b>Reg-1</b>	Regnasa-1
<b>RPMI</b>	Medio de cultivo (Roswell Park Memorial Institute)
<b>RT</b>	<i>Room temperature</i>
<b>SCID</b>	<i>Severe combined immunodeficiency</i>
<b>SD</b>	<i>Standard deviation</i>

Abreviatura	Significado
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
<b>SEE</b>	<i>Staphylococcal enterotoxin E</i>
<b>SH2</b>	<i>Src-homology 2</i>
<b>SH2D1A</b>	<i>SH2 domain-containing protein 1A</i>
<b>SH3</b>	Dominio de unión a prolina
<b>SI</b>	<i>Immunological synapse</i>
<b>SSM</b>	<i>Second site mutation</i>
<b>TCR</b>	<i>T cell receptor</i>
<b>TEMED</b>	N,N,N,N'-tetrametilendiamina
<b>TESK</b>	<i>Testicular protein kinase</i>
<b>TNF</b>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<b>Tris</b>	(hidroximetil) aminometano
<b>TYK</b>	<i>Tyrosine kinase</i>
<b>U</b>	Unidades
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i>
<b>V</b>	Voltio
<b>w</b>	Pocillo ( <i>well</i> )
<b>WAS</b>	Síndrome de Wiskott Aldrich
<b>WASP</b>	<i>Wiskott Aldrich Syndrom proteine</i>
<b>WHIM</b>	<i>Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis.</i>
<b>WT</b>	<i>Wild type</i>
<b>XL-EDA-ID</b>	<i>Anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency</i>
<b>ZAP70</b>	<i>Zeta-chain-associated protein of 70 kDa)</i>





---

## **3.-Introducción**

---



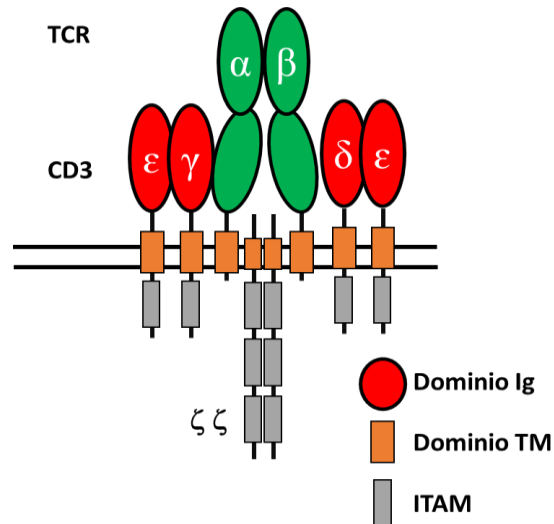
Los linfocitos T son células de la inmunidad adaptativa que se caracterizan por sus receptores variables TCR (*T Cell Receptor*), que se generan por el reordenamiento génico de sus genes. Este sistema permite que cada célula individual presente un TCR diferente que le permita reconocer un patógeno distinto.

Los linfocitos T se dividen en dos categorías en función del tipo de TCR que expresan: los linfocitos TCR $\alpha\beta$ , mayoritarios, y los TCR $\gamma\delta$ , minoritarios. Los linfocitos tienen dos funciones principales, que son reconocer y eliminar células infectadas y reconocer antígenos y coordinar el resto de la respuesta inmunitaria. (Abbas et al, 2007)

### 3.1.-El TCR

El TCR es un complejo receptor de membrana formado por ocho cadenas agrupadas en cuatro dímeros. El primero de todos es el dímero variable  $\alpha\beta$ , formado por las cadenas TCR $\alpha$  y TCR $\beta$  en linfocitos  $\alpha\beta$ , TCR $\gamma$  y TCR $\delta$  en los linfocitos  $\gamma\delta$  respectivamente, y son estas cadenas las encargadas de reconocer el antígeno cuando éste les es presentado por una célula presentadora de antígeno mediante el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los genes de estas dos cadenas se encuentran fraccionados en segmentos V, D (Solo en TCR $\beta$ ) J y C, habiendo millones de combinaciones por permutación diferentes. Estas dos moléculas constan de dos dominios inmunoglobulina (Ig) y una región transmembrana (TM), siendo la región intracelular demasiado corta para transmitir ninguna señal. Junto a las cadenas TCR $\alpha\beta$  se encuentran las cadenas invariables del TCR. Estas cadenas son CD3 $\gamma$ , CD3 $\epsilon$ , CD3 $\delta$  y CD247 (también conocida como cadena  $\zeta$ ). Las proteínas CD3 son proteínas de membrana con un dominio IG extracelular, una región transmembrana por la cual heterodimerizan de forma covalente (CD3 $\gamma$ -CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ -CD3  $\epsilon$ ) y una región intracelular con un dominio ITAM que consiste en dos tirosinas precedidas tres posiciones antes de leucinas o isoleucinas. CD247 es el único homodímero del TCR, y difiere del resto de cadenas invariables en que apenas tiene región extracelular, y sin embargo presenta una

región citoplasmática más larga que las cadenas CD3 con tres ITAMs consecutivos. Estos dímeros se mantienen unidos y transmiten su señal a través de uniones electrostáticas de residuos cargados en su región transmembrana (Call et al., 2002) (**Figura 3.1**).



**Figura 3.1.** El receptor de células T. Esquema de las cadenas que componen el TCR y su estructura.

La alta complejidad del TCR y la importancia biológica que desempeña hacen que el proceso de ensamblaje y transporte sea muy sensible y regulado. En el retículo endoplásmico se generan los dímeros y también se ensamblan TCR $\alpha\beta$ -CD3 $\gamma\epsilon$ -CD $\delta\epsilon$ , formándose un TCR hexamérico incompleto que es transportado al aparato de Golgi donde espera a unirse al dímero CD247-CD247. Si no se incorpora CD247, el TCR no se transporta hasta la superficie, se retiene en el aparato de Golgi y se transporta a lisosomas para su degradación (Sussman et al., 1988).

Cuando el TCR se une a su epítipo, el TCR sufre un cambio conformacional por el cual las colas intracelulares de las cadenas invariables salen de la membrana plasmática, donde se encuentran unidas en estado de inactivación, y quedan expuestos sus motivos ITAM. Una vez se exponen los ITAMs, son fosforilados

por quinasas, y se les unen otras quinasas como ZAP70, comenzando una cascada de señales en varias vías que dan como consecuencia la activación de respuestas efectoras, la proliferación del linfocito o la reorganización del citoesqueleto (Gaud et al., 2018).

### 3.2.-Complejo CBM

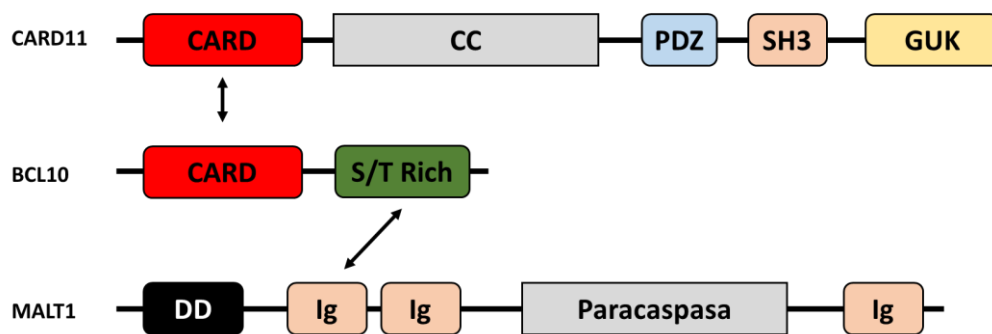
El complejo CBM (CARD-BCL10-MALT1) es un multímero de gran tamaño que señala en multitud de linajes celulares, tanto hematológicos como de otros tejidos. Este complejo consta de tres proteínas diferentes (**Figura 3.2**):

Una proteína iniciadora del complejo: esta proteína es el componente variable del CBM, que en función del linaje celular expresa una proteína de la familia CARD diferente. Así, en linajes linfoides se expresa CARD11, en mieloides CARD9, en queratinocitos CARD14 y en células de la dermis y endotelio CARD10 (Rosebeck et al., 2011). Estas proteínas constan de un dominio CARD de polimerización por el cual interacciona con BCL10, un dominio CC con el que dimerizan con otros CARD y un dominio de asociación a la membrana MAGUK (PDZ, SH3 y dominio GUK). A este dominio en linfocitos se le atribuye la función de formar el complejo de señalización en la región sináptica (Thome et al., 2010). En CARD9 este dominio está ausente.

Esqueleto del complejo: la proteína BCL10 (*B Cell Lymphoma 10*) es una pequeña proteína adaptadora sin ninguna función de señalización propia, más que la de reclutar a otras proteínas. Esta proteína consta de un dominio CARD con el que se une a la proteína iniciadora CARD activada y con el que también se une a otras moléculas BCL10 para autopolimerizar, y otro dominio rico en serinas y treoninas con el que interacciona con MALT1 (Gehring et al., 2018). Además del CBM, BCL10 forma parte de

la respuesta de reparación a daños en el ADN (Ismail et al., 2016), trasladándose a las zonas de daño y reclutando proteínas de la maquinaria de reparación del ADN como RAD50 y BRCA1.

Proteína transmisora de la señal: MALT1. La paracaspasa MALT1 (*Mucosa-Associated Lymphoid tissue lymphoma Translocation protein 1*) es una paracaspasa que presenta un dominio con funciones proteolíticas, un *Dead Domain* (DD) y tres dominios inmunoglobulina con los que interacciona con BCL10 (Thome, 2008). Esta proteína está muy conservada filogenéticamente, existiendo proteínas con homólogos hasta el filo de los cnidarios (Staal et al., 2018).



**Figura 3.2. Componentes del CBM.** Esquema con la estructura de las proteínas CARD11, BCL10 y MALT1.

### 3.2.1.-Activación y señalización del CBM en linfocitos T

Cuando se activa el TCR y se desencadena su señalización, se producen una serie de pasos ya descritos anteriormente hasta que se llega a PCK $\theta$ . Esta quinasa fosforila CARD11, que se encuentra inactiva, plegada con las regiones CARD y MAGUK ocultas, y se despliega comenzando a formar complejos con otras moléculas CARD por el dominio CC y SH3, se unen a la membrana y comienzan a reclutar las primeras moléculas de BCL10 (David et al., 2018). BCL10 y MALT1, que ya se encuentran unidos sin necesidad de polimerización

(Schlauderer et al., 2018), empiezan a auto polimerizar a través del dominio CARD de BCL10 partiendo del complejo CARD11 activo que se comporta como nucleador (David et al., 2018).

Una vez el complejo está formado, este señala a través de MALT1 por dos vías diferentes que serán descritas a continuación.

#### Ruta de activación de NF- $\kappa$ B

A MALT1 se le une TRAF6 (David et al., 2018) y este ubiquitina MALT1 en la posición K63 (Sun et al., 2004). Sobre esta modificación se recluta TAK1. Por un lado, TAK1 recluta y activa a las proteínas MAPKs JNK y P38 (Ruland and Hartjes, 2019), y por otro, activa a la quinasa IKK $\alpha$ , que a su vez fosforila a I $\kappa$ B $\alpha$ , la proteína represora de NF- $\kappa$ B. Al fosforilarse I $\kappa$ B $\alpha$ , esta se disocia de NF- $\kappa$ B, que se transloca al núcleo y ejerce su función transcripcional.

#### Actividad proteasa

MALT1 tiene además actividad proteolítica propia como proteasa a través de su dominio paracaspasa, con el cual proteoliza proteínas concretas que están implicadas en rutas de señalización proinflamatorias (Ruland and Hartjes, 2019).

Esta paracaspasa proteoliza una secuencia diana específica LVSRG, cortando a la altura de la arginina (Wiesmann et al., 2012). Entre las dianas de MALT1 se encuentran BCL10 y la propia MALT1, un bucle que le sirve como forma de acotar el tiempo y la intensidad y de la señal del CBM, CYLD, A20 y HOIL1 y RELB que regulan la vía de activación de NF- $\kappa$ B y las proteínas de unión a ARN Regnasa-1 Roquin-1 y Roquin-2 (Demeyer et al., 2016).

Las proteínas de unión a ARNs o RBPs (*RNA binding protein*), son proteínas antiinflamatorias que se unen a un motivo específico de la región 3' UTR de ARNs proinflamatorios para promover su degradación. Estas proteínas se



expresan constitutivamente en multitud de tipos celulares, entre ellos los linfocitos T, y actúan como un segundo nivel de represión postranscripcional. Cuando el linfocito se activa, estas proteínas son proteolizadas para permitir la traducción de los RNA proinflamatorios. Entre los genes cuyos mensajeros son reprimidos por esta vía se encuentran *IL-6*, *IL-2*, *IFN $\gamma$* , *ICOS*, *Ox40*, *CD25* o *IRF4* (Takeuchi, 2018).

### **3.3.-Inmunodeficiencias primarias**

Cuando uno o varios genes con relevancia para el sistema inmunitario presentan una mutación por la que la función que desempeña no la cumple adecuadamente, se produce una inmunodeficiencia primaria. Hay reportados cientos de genes con mutaciones que se asocian con inmunodeficiencia. Según el papel del gen comprometido, las inmunodeficiencias afectan a diferentes poblaciones del sistema inmunitario con rasgos fenotípicos y funcionales diferenciados, y susceptibilidad por infecciones diferenciadas (Al-Herz et al., 2014).

#### **3.3.1.-Deficiencias del TCR (TCRID)**

Dentro de las inmunodeficiencias congénitas, las TCRID son muy poco frecuentes y existen pocos pacientes descritos (Marin et al., 2014). Estas enfermedades se deben al defecto de alguna de las cadenas que componen el TCR, que impide su ensamblaje y función de manera parcial o completa, por lo que la característica común de estos defectos es un paciente con SCID a edad temprana y una linfopenia específica de linfocitos T que, además, presenta un defecto de expresión de CD3 en superficie. No todas las cadenas tienen el mismo papel dentro del TCR y, por lo tanto, no todas afectan a los parámetros anteriores de la misma manera (**Tabla 3.1**)

En los defectos completos de CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$ , los linfocitos, que durante su desarrollo en el timo no pasan la selección positiva al no poder expresarse el TCR, no llegan periferia y el paciente presenta una linfopenia total en sangre. La deficiencia de en cualquiera de estas cadenas es muy grave, y el paciente no sobrevive si no recibe un trasplante de células madre lo antes posible (**Tabla 3.1**).

En ambas inmunodeficiencias se han reportado además deficiencias parciales con linfopenias menos restrictivas (en torno al 35% de las PBLs totales) y niveles de expresión del TCR no tan reducidos como en la inmunodeficiencia total. En el caso de la deficiencia parcial de CD3 $\epsilon$  el único paciente conocido no desarrolló SCID ni necesitó un trasplante (Soudais et al., 1993), mientras que en los tres casos de deficiencia parcial de CD3 $\delta$ , todos precisaron de un trasplante de médula, y solo uno de ellos llegó a sobrevivir (Gil et al., 2011). Estos pacientes presentaban además un aumento de la proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ , y un aumento significativo de una población sumamente rara en individuos sanos que son los linfocitos T $\gamma\delta$  CD4<sup>+</sup> (Garcillan et al., 2014)

En el caso de CD3 $\gamma$  esta cadena parece ser más redundante que las dos anteriores, y los linfocitos consiguen pasar la selección tímica con un defecto parcial de expresión de TCR en superficie. La gravedad de la deficiencia de esta cadena es menor, teniendo una edad media de diagnóstico más elevada y una alta supervivencia en pacientes sin trasplantar. Sin embargo, esta deficiencia específica se asocia a problemas autoinmunes y afectación de linfocitos T reguladores (Gokturk et al., 2014; Rowe et al., 2018).

De la cadena TCR $\alpha$ , se han observado dos hermanos con un defecto total en debido a una mutación en la región constante, por lo que afectaba a cualquier tipo de reordenamiento. Estos pacientes presentan una linfopenia selectiva de linfocitos T  $\alpha\beta$ , pero de manera compensatoria presentaban niveles muy elevados de linfocitos  $\gamma\delta$  que al no usar la cadena TCR $\alpha$ , pueden generar un TCR completo y pasar la selección en el timo de manera normal (Morgan et al., 2011).

**Tabla 3.1: Casos observados de inmunodeficiencias del TCR.** Aspectos clínicos y moleculares

Gen	Pacientes	% supervivencia		Edad media al diagnóstico (meses)	% CD3+ (PBL)	Mutación		Referencia
		sin TPH	con TPH			Molecular	Proteína	
<i>CD3E</i>	4	0	50	2	2	c.520+2T>C	p.P34_R117del	(Soudais et al., 1993)
						c.230G>A	p.W59X	(de Saint Basile et al., 2004)
						c.128_129del	p.T43fsX56	(Fuehrer et al., 2014)
<i>CD3D</i>	16	0	53	3	3	c.49+1G>C	p.0	(Dadi et al., 2003), (de Saint Basile et al., 2004) (Marcus et al., 2011)
						c.202C>T	p.R68X	(de Saint Basile et al., 2004)
						c.279C>A	p.C93X	(Takada et al., 2005)
<i>TCRa</i>	2	–	100	6 y 15	36	c.275-2A>G	p.M92_A136del	(Morgan et al., 2011)
<i>CD247</i>	3	–	33	2-10	48	c.*G>A	p.T107LfsX56	(Rieux-Laucat et al., 2006)
						c.207C>T	p.Q70X	(Roberts et al., 2007)
						c.411insC	p.D138RfsX272	(Marin et al., 2017)
<i>CD3G</i>	11	80	0	110	35	c.2T>C	p.M1T	(Arnaiz-Villena et al., 1992)
						c.1A>G	p.M1V	(Recio et al., 2007)
						c.205A>T	p.K69X	(Arnaiz-Villena et al., 1992)
						c.80(-1)G>C	p.N28VfsX1	(Gokturk et al., 2014) (Tokgoz et al., 2013)
<b>Total</b>	36					c.del213A	p.K71NfsX39	Lee ( <i>in press</i> )

### 3.3.2.-Deficiencia de CD247

La deficiencia de la cadena CD247 ha sido observada en tres pacientes, todos ellos pediátricos, con SCID, linfopenia T moderada y linfocitos T con niveles muy bajos de TCR extracelular.

El primer paciente con deficiencia de CD247, descrito por Rieux-Laucat (Rieux-Laucat et al., 2006), debutó con cuatro meses y presentaba infecciones recurrentes por virus EBV e infecciones fúngicas y bacterianas. Mostraba números normales de linfocitos T y NK, mientras que los linfocitos T se encontraban a niveles muy bajos y con un defecto de expresión del CD3 muy acusado, así como inversión CD3/CD4. Estas células no eran funcionales cuando eran estimuladas con anti-CD3.

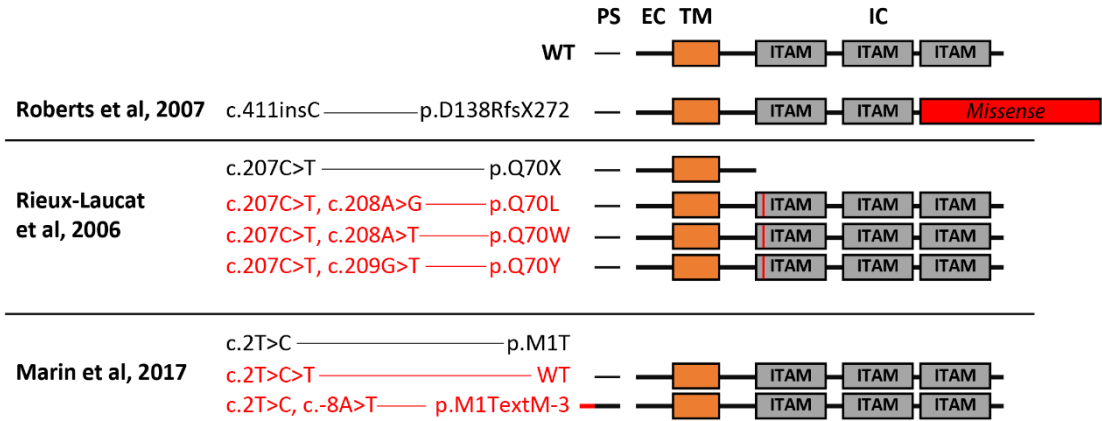
La alteración molecular que presentaba era una mutación de codón de parada prematura, eliminaba la mayor parte de la región citoplasmática de CD247, quedando suprimidos los tres ITAMs (p.Q70X). El 10% de los linfocitos T CD4 tenían niveles normales de expresión de CD3 en superficie, viéndose por secuenciación que estas células eran una mezcla de células con tres mutaciones somáticas diferentes revertientes en el mismo codón que la mutación germinal, que generaban mutaciones *missense*, pero eliminaban el codón de parada prematuro (p.Q70L, p.Q70W y p.Q70Y). Estas células revertientes, sin embargo, no eran funcionales.

El segundo paciente descrito (Roberts et al., 2007), presentaba una clínica similar con debut a los cuatro meses y numerosas infecciones bacterianas y por CMV. La linfopenia T era menos acusada, aunque eran linfocitos con niveles bajos de TCR y no respondían a estímulos. La población de células revertientes en este caso era bastante menor en comparación con el primer paciente (0,6%), aunque no fueron secuenciadas. A nivel genético el paciente presentaba en homocigosis la mutación c.411insC, que rompía el marco de lectura generando un péptido aberrante de 134 aminoácidos, aunque los estudios hechos en este caso demostraron que la proteína resultante no se expresaba.

El tercer caso fue descrito por nuestro grupo de investigación entre 2016 y 2017 (Marin et al., 2017; Vales-Gomez et al., 2016). Este caso relataba una niña turca de padres consanguíneos que sufrió su primera infección a los dos meses de edad al desarrollar BCGitis tras la vacuna BCG, y posteriormente presentar una infección aguda por CMV y *parainfluenza*. A nivel inmunológico, presentaba una linfopenia T con inversión CD4/CD8 y valores normales de NK, pero bajos de linfocitos B. La inmunoglobulina IgG también se encontraba elevada, aunque el resto no.

Esta paciente presentaba la mutación c.2T>C en homocigosis que eliminaba el codón de inicio, impidiendo la traducción de la proteína y generando un defecto completo de esta. Estas células no eran funcionales al ser estimuladas vía TCR. La

paciente presentaba una pequeña población con niveles normales de CD3 en superficie (0.36% de las células CD3) y expresión de CD247. Su secuenciación arrojó dos mutaciones revertientes: la primera, revertía a la secuencia WT (*back mutación*) y la segunda generaba un nuevo codón de inicio tres posiciones antes que el original, dando lugar a un péptido señal tres aminoácidos más largo que, al ser cortado durante la traducción, generaba una proteína CD247 normal (p.M1TextM-3).



**Figura 3.3. Mutaciones en CD247.** Resumen de las mutaciones germinales (Negro), y somáticas (Rojo), reportadas hasta la fecha en CD247. PS: péptido señal, EC: extracelular, TM: transmembrana, IC: intracelular.

### 3.3.3.-Reversiones somáticas

Se han descrito pacientes con enfermedades genéticas, especialmente en casos inmunodeficiencias primarias, que presentaban una proporción de células que habían sufrido una mutación somática que rescataba la expresión o función de la proteína afectada.

Este fenómeno ocurre generalmente en enfermedades las cuales el defecto tiene lugar en células con alta tasa de replicación como la piel, o inmunitarias, principalmente con afectación linfoide.

Se han descrito decenas de genes en los que se han documentado pacientes con deficiencia y mutaciones somáticas (**Tabla 3.2**). El alto proceso de control del

desarrollo y maduración de los linfocitos T y B para evitar autoinmunidad y su bloqueo en algunas deficiencias que impide el desarrollo de estos mismos, hace que estas mutaciones revertientes supongan una ventaja selectiva respecto al resto de células no revertientes.

No se conoce un mecanismo específico por el cual estas mutaciones sean dirigidas, aunque no en todos los genes ocurre con la misma frecuencia. Este tipo de mutaciones son muy poco frecuentes, y son muy pocos los pacientes descritos con este tipo de mosaicismos, siendo el caso más frecuente el de las reversiones somáticas en el síndrome de Wiskott-Aldrich, donde se estima que aproximadamente el 10% de los pacientes pueden presentar poblaciones de linfocitos revertientes (Stewart et al., 2007). El consenso general es considerar que estas mutaciones ocurren al azar y presentan una ventaja selectiva al más puro estilo darwiniano, y si esta ventaja selectiva desaparece, la población revertiente se pierde, como por ejemplo un paciente con deficiencia de ADA con reversión en linfocitos T en el que al someterle a tratamiento con PEG-ADA esta desaparece (Moncada-Velez et al., 2011).

Las reversiones somáticas se pueden clasificar por su localización: cuando la mutación somática es la reversión exacta a la secuencia original hablamos de *back mutation* (BM) y cuando se trata de mutaciones que ocurren próximas a la germinal que contrarrestan el defecto, pero con pequeños cambios en la proteína resultante, hablamos de *second site mutation* (SSM). También se han dado casos de defectos con heterocigotos compuestos en los que ocurren recombinaciones intragénicas que generan un alelo WT y otro alelo con las dos mutaciones.

Principalmente las reversiones ocurren sobre linfocitos T CD4, pero también en linfocitos CD8 y linfocitos B. La presencia de reversiones somáticas no implica una alteración sobre la clínica del afectado, siendo muy pocos los casos en los que se reduce la sintomatología (Le Guen et al., 2015).

La inmunodeficiencia por deficiencia de CD247 es un caso singular. En primer lugar, de los tres pacientes descritos, todos presentaban reversiones

somáticas. El primer paciente presentaba un 10% de células revertientes con tres SSM diferentes; en el segundo paciente, aunque no se secuenciaron, sí fue descrita una proporción de células con niveles elevados de CD3 en superficie, y el tercero tenía una pequeña población revertiente con dos mutaciones, una BM y otra SSM.

En segundo lugar, aunque el defecto de las cuatro cadenas invariantes del TCR causan una IDP grave y el defecto de CD3 $\epsilon$  y CD3 $\delta$  concretamente produce un bloqueo completo del desarrollo T (los pacientes tienen una ausencia completa de linfocitos T en sangre), solo en el gen de *CD247* se han reportadas reversiones (Marin et al., 2014). Aunque este fenómeno sea aleatorio, el hecho de que ninguno de los otros genes del TCR reporten reversiones y en *CD247* haya ocurrido en todos los casos hace pensar que hay algún factor desconocido que lo facilita en ciertos genes todavía.

### **3.3.4-Defectos del CBM**

Se han registrado mutaciones y polimorfismos asociados a patología en todos los genes que componen el complejo CBM en linfocitos, teniendo características clínicas comunes y particularidades de cada gen.

En *CARD14*, que constituye el complejo en células de queratinocitos, células de la dermis y endotelio, se han reportado mutaciones de ganancia de función asociadas con psoriasis (Peled et al., 2019), mientras que mutaciones hipomórficas están asociadas a dermatitis atópica severa e infecciones recurrentes víricas respiratorias y cutáneas (Ma et al., 2017).

*CARD9*, que se expresa solo en células mieloides, es el que mayor número de pacientes descritos presenta, y su deficiencia se asocia a una inmunodeficiencia específica contra hongos, ya que señala para receptores antifúngicos (Dectina 1 y 2) (Li et al., 2017).

**Tabla 3.2: Inmunodeficiencias primarias con reversiones somáticas reportadas**

Deficiencia de CARD11

Gen	Proteína	Enfermedad	Tipo de mutación	Reversiones múltiples	Impacto clínico	Referencia
<b>ADA</b>	Adenosina Deaminasa	SCID	BM SSM Deleción	Si	No	(Moncada-Velez et al., 2011) (Arredondo-Vega et al., 2002)
<b>ARPC1B</b>	Arp2/3	CID	BM	No	No	(Brigida et al., 2018)
<b>CARD11</b>	CARD11/C ARMA1	CID	SSM	No	Si	(Fuchs et al., 2015)
<b>CD247</b>	CD3z	SCID	BM SSM	Si	No	(Rieux-Laucat et al., 2006) (Roberts et al., 2007) (Marin et al., 2017)
<b>CXCR4</b>	CD284	Síndrome de WHIM	Cromotripsis	No	Yes	(McDermott et al., 2015)
<b>DOCK8</b>	DOCK8	HIES	BM SSM Recomb. intragénica Deleciones	Si	Si	(Jing et al., 2014) (Xie et al., 2015) (Zhang et al., 2016)
<b>IKBKG</b>	NEMO	(XL-EDA-ID)	Pérdida de la región duplicada	No	No	(Nishikomori et al., 2004)
<b>IL2RG</b>	CD132	SCID	BM SSM	Si	Si	(Kawai et al., 2012) (Kuijpers et al., 2013) (Okuno et al., 2015)
<b>ITGB2</b>	CD18	LAD	BM SSM	Si	Si	(Uzel et al., 2008) (Tone et al., 2007)
<b>JAK3</b>	JAK3	SCID	BM	No	No	(Ban et al., 2014)
<b>LIG4</b>	Ligasa-IV	SCID	Recomb. intragénica	No	No	(Jiang et al., 2016)
<b>MYSM1</b>	MYSM1	Dishemato poyesis y falta de células B	BM	No	Si	(Le Guen et al., 2015)
<b>RAG1</b>	RAG-1	SCID, Síndrome de Omenn	BM Inserciones	Si	Si	(Crestani et al., 2014) (Wada et al., 2005)
<b>SH2D1A</b>	SAP	XLP	BM SSM	Si	Si	(Palendira et al., 2012)
<b>STAT3</b>	STAT3	HIES	BM	No	Si	(Alcantara-Montiel et al., 2016)
<b>WAS</b>	WASP	Síndrome de Wiskott Aldrich	BM SSM Múltiples mutaciones	Si	Si	(Stewart et al., 2007) (Davis and Candotti, 2009; Davis et al., 2008) (Wada et al., 2003)



Mientras que mutaciones de ganancia de función en CARD11 son oncogénicas y se asocian a linfomas B y T cutáneos (Juilland and Thome, 2016) por una activación constitutiva del complejo CBM, y por ende NF- $\kappa$ B, las mutaciones de pérdida de función implican una inmunodeficiencia combinada con infecciones recurrentes respiratorias. A nivel inmunitario estos pacientes presentan baja cantidad de inmunoglobulinas y número normal de linfocitos, aunque con baja proporción de linfocitos B de memoria. Los linfocitos T tienen un defecto de proliferación en presencia de mitógenos anti CD3/CD28 y PHA (Stepensky et al., 2013).

#### Deficiencia de BCL10

BCL10 fue descrito como un oncogén, y traslocaciones en el mismo son muy comunes en linfomas B (Rosebeck et al., 2011).

Hasta la fecha solo hay un caso registrado con deficiencia de BCL10 (Torres et al 2014). En él, se describe a un niño de tres años con infecciones fúngicas, bacterianas y víricas graves en multitud de tejidos, que se tradujeron en infecciones en sistema nervioso, diarrea crónica, sepsis e infecciones cutáneas y respiratorias. El paciente tenía niveles de inmunoglobulinas bajos. Las respuestas por receptores innatos TLRs y de dectina fueron normales en células mieloides, pero la señalización de esos mismos receptores en fibroblastos estaba profundamente afectada. A nivel linfoide, presentaba un número normal linfocitos B y T, pero con niveles muy bajos de células de memoria y ausentes de linfocitos T reguladores. Los linfocitos T ante estimulación anti CD3/CD28 expresaban correctamente los marcadores de activación CD69 y CD40L, pero no ICOS, cuya inducción estaba muy afectada. La proliferación por estimulación con anti-CD3/CD28 también se vio bloqueada. En un estudio posterior se comprobó que la reparación del ADN por la vía HR también se encontraba afectada (Garcia-Gomez et al., 2019).

#### Deficiencia de MALT1

La deficiencia de MALT1 tiene unos rasgos muy similares al defecto de BCL10, lo que es esperable, ya que ninguna de las dos proteínas puede tener función sin la otra. Los pacientes con mutaciones en MALT1 presentan un amplio espectro de infecciones víricas, bacterianas y fúngicas. A nivel linfoide tienen números normales de linfocitos T y B, pero con baja proporción de células de memoria. Las células T reguladoras están severamente disminuidas. A nivel funcional estos pacientes no producen anticuerpos específicos y sus linfocitos T no responden a estímulos como proliferación o producción de IL-2 (Frizinsky et al., 2019; Jabara et al., 2013; Punwani et al., 2015).



---

## **4.-Objetivos**

---

-

En esta tesis nos proponemos generar y caracterizar líneas celulares que puedan ser utilizadas para el estudio de dos inmunodeficiencias congénitas que afectan la funcionalidad de los linfocitos T en distintos compartimentos. En primer lugar se estudiará la inmunodeficiencia originada por la ausencia de CD247, perteneciente al complejo transmembranal del TCR (TCR/CD3/CD247), responsable del reconocimiento antígeno. En segundo lugar se analizará la inmunodeficiencia causada por la ausencia de BCL10, perteneciente al complejo citoplasmático del CBM (CARD-CC/BCL10/MALT1), responsable de la señalización por la vía de NF- $\kappa$ B. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Generar modelos celulares que permitan evaluar la patogenicidad y, por consiguiente, la relevancia clínica de las mutaciones germinales y somáticas en CD247 identificadas en pacientes.

1.1 Caracterizar la línea HTLV-1 deficiente de CD247 generada con anterioridad a partir de los linfocitos T primarios del paciente descrito por Marin et al

1.2 Generar una línea deficiente de CD247 mediante edición genómica de Jurkat empleando el sistema CRISPR/Cas9.

1.3 Generar construcciones portadoras del gen *CD247* normal y de las mutaciones germinales (Q70X, Q101X) y somáticas (Q70L, Q70W, y Q70Y) descritas en otros pacientes.

1.4 Optimizar diferentes sistemas de electroporación y transducción para la incorporación de dichas construcciones en las líneas anteriores.

1.5 Analizar la restauración (o inhibición) de la expresión en superficie del TCR en las líneas anteriores después de introducir las diferentes variantes de CD247, en comparación con la línea de ratón deficiente de CD247 utilizada habitualmente (MA5.8).

2. Analizar la señalización por rutas que emanan del TCR con líneas deficientes de BCL10.

2.1 Estudiar la señalización y activación de linfocitos T en una línea derivada de un paciente deficiente de BCL10.

2.2 Generar líneas deficientes homocigota y heterocigota de BCL10 mediante edición genómica de Jurkat empleando el sistema CRISPR/Cas9.

2.3 Estudiar el impacto de la condición de heterocigoto para la deficiencia de BCL10.



---

## **5.-Material y métodos**

---





**Tabla 5.1.** Cebadores utilizados. Todos los cebadores fueron sintetizados por Invitrogen, salvo CD247 y BCL10CRISPR que, junto a las guías, fueron sintetizados por IDT.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')
<b>CD247</b>	<i>Genotipado</i>	
	CD247- Exón1	F GAGAGGGTTGTGATCAGGCTGAG
		R ACACACTTGGCTGGTCCTTGC
	<i>Clonaje pEGFP-N1</i>	
	CD3ZGFP	F GCCAAGCTTGCCACCATGAAGTGAAGGCGCTTTTC
		R GCGGTACCCGAGGGGGCAGGGCCTG
		R2 GCGGTACCCCGTTCTGGCCCTGCTGGTAC
		R3 GCGGTACCGGCTTCCCCCATCTCAGGGTC
	pEGFP-N1	F CGTCAGATCCGCTAGCGCTA
		R GTGGTGCAGATGAACTTCAG
	<i>Mutagénesis</i>	
	Q70W	F CAGGGCCAGAACTGGCTCTATAACGAG
		R CTCGTTATAGAGCCAGTTCTGGCCCTG
	Q70L	F GGGCCAGAACTTGCTCTATAACGAGC
		R GCTCGTTATAGAGCAAGTTCTGGCCC
	Q70Y	F CCAGCAGGGCCAGAACTATCTCTATAACGAGCT
		R GAGCTCGTTATAGAGATAGTTCTGGCCCTGCTGG
	CD247 Iso-1	F TGGGGGGAAAGCCGCAGAGAAGGAAGAACCC
		R GGGTTCTTCCTTCTCTGCGGCTTCCCCCA
	<i>Clonaje en Retrovirus</i>	
	CD3Z-RV	F CGGAATTCATGAAGTGGTCAAGGCGCTTTACC
		R1 CGCTCGAGTTAGCGAGGGGGCAGGGCCTG
		R2 CGCTCGAGTTAGTTCTGGCCCTGCTGGTA
	pLZRS	F ATCGCAGCTTGGATACACGCCG
		R TATTCCAAGCGGCTTCGGCCAGTA
	<i>CRISPR</i>	
	Guía	GCTCAATCTAGGACGAAGAGAGG
	CD247 CRISPR	F ATGAAGTGGAAGGCGCTTTTCACCGCG
		R CAGGGCCTGCATGTGAAGGGCGTCGT
<b>BCL10</b>	<i>Genotipado líneas</i>	
	BCL10 Exón1	F CTCCTTCTTCCCCATTACCCG
		R CTGTGCTAGGACTTTCCGCT
	<i>Guía CRISPR</i>	
	Guía	CGCACCGTCCCTCACCGAGG
	BCL10 CRISPR	F AAGCGCTACGTTTGACCC
		R GGATCCTTCACCTGGTACAGC

**Tabla 5.2.** Anticuerpos utilizados.

Antígeno	Especie	Especificidad	Isotipo	Casa comercial	Aplicación
<i>Anticuerpos primarios</i>					
<b>CD3<math>\epsilon</math> (clon UCHT1)</b>	Ratón	Humano	IgG1	Beckman Coulter	FACS
<b>CD3<math>\epsilon</math> (clon OKT3)</b>	Ratón	Humano	IgG1	eBioscience	Act.
<b>CD3<math>\epsilon</math> (clon 2C11)</b>	Hámster	Ratón	IgG	eBioscience	FACS
<b>TCR<math>\alpha\beta</math> (clon IP26)</b>	Ratón	Humano	IgG1	Invitrogen	FACS
<b>CD4</b>	Ratón	Humano	IgG1	Beckman Coulter	FACS
<b>CD271</b>	Ratón	Humano	IgG1	BD Biosciences	FACS
<b>CD247 (<math>\zeta</math>) 448</b>	Conejo	Humano/Ratón		Dr. Balbino Alarcón	WB
<b>CD247 (<math>\zeta</math>) Clon 6B10.2</b>	Ratón	Humano	IgG1	BioLegend	FACS, WB
<b>GFP</b>	Conejo	GFP		Sigma Aldrich	WB
<b>BCL10</b>	Conejo	Humano	IgG	Abcam	FACS, WB
<b>IRF4</b>	Rata	Humano/Ratón	IgG1	eBioscience	FACS
<b>CD25</b>	Ratón	Humano	IgG1	Invitrogen	FACS
<b>CD69</b>	Ratón	Humano	IgG2	Invitrogen	FACS
<b>ICOS</b>	Ratón	Humano	IgG1	eBioscience	FACS
<b>IFN <math>\gamma</math></b>	Ratón	Humano	IgG1	Invitrogen	FACS
<b>TNF <math>\alpha</math></b>	Ratón	Humano	IgG1	BD Biosciences	FACS
<b>IL-2</b>	Ratón	Humano	IgG1	Invitrogen	FACS
<b>Regnasa-1</b>	Conejo	Humano	IgG	GeneTex	FACS
<b>HLA-ABC</b>	Ratón	Humano	IgG1	BD Biosciences	FACS
<b><math>\alpha</math>-Tubulina</b>	Ratón	Humano	IgG1	Sigma Aldrich	WB
<b>ERK-1</b>	Ratón	Humano	IgG1	Cell Signaling	WB
<i>Controles de isotipo</i>					
<b>IgG1 de ratón</b>	Ratón	Ratón	IgG1	BD Biosciences	FACS
<b>IgG2a de ratón</b>	Ratón	Ratón	IgG2a	BD Biosciences	FACS
<b>IgG1 de rata</b>	Rata	Rata	IgG1	eBioscience	FACS
<i>Anticuerpos secundarios</i>					
<b>Conejo APC</b>	Cabra	Conejo	IgG	Invitrogen	FACS
<b>Goat <math>\alpha</math>-ratón</b>	Cabra	Ratón		LI-COR	WB
<b>Goat- <math>\alpha</math>-conejo</b>	Cabra	Conejo		LI-COR	WB

**Tabla 5.3.** Disoluciones y tampones empleados.

Nombre	Componentes	Concentración
<b>Tampón FACS</b>	PBS	1X
	EDTA	1 mM
	BSA	0,5%
<b>Medio SOC</b>	Triptona	20 g/l
	<i>yeast extract</i>	5 g/l
	NaCl	0,5 M
	MgSO <sub>4</sub>	1M
	Glucosa	2M
<b>Tampón de lisis RIPA</b>	Tris-HCl	20 mM
	NaCl	150 mM
	NP40	1%
	SDS	0,1%
	Glicerol fosfato	10 mM
<b>Tampón de carga Laemmli</b>	Tris-Cl pH 6.8	60 mM
	SDS	2%
	Glicerol	10%
	β-mercaptoethanol	5%
	bromophenol blue	0,01%
<b>Tampón de electroforesis (SDS-PAGE)</b>	Trizma <sup>®</sup> base	25 mM
	Glicina	200 mM
	Metanol	20%
<b>Tampón de transferencia (SDS-PAGE)</b>	Trizma <sup>®</sup> base	25 mM
	Glicina	200 mM
	Metanol	20%
<b>Tampón Tris salino (TBS)</b>	Tris-HCl (pH 7,6)	50 mM
	NaCl	150 mM
<b>Gel concentrador (SDS-PAGE)</b>	Tris-HCl	125 mM
	Acrilamida	4,5%
	SDS	0,1%
	APS	0,1%
	TEMED	0,1%
<b>Gel separador (SDS-PAGE)</b>	Tris-HCl (pH)	375 mM
	Acrilamida	10-15%
	SDS	0,1%
	APS	0,1%
	TEMED	0,04%

## 5.1.-Generación de plásmidos

### pEGFP-N1

Para las transfecciones se utilizó el plásmido pEGFP-N1. Se trata de un plásmido bacteriano con gen de resistencia a kanamicina para la generación de proteínas de fusión a EGFP en su extremo C-terminal (**Figura 5.1**).

A partir un plásmido pJET1.2 portador del ADNc de *CD247*, (cortesía del Dr. Hugh Reyburn, CNB, Madrid), se amplificó *CD247* mediante PCR con la enzima Taq polimerasa *High Fidelity* (Roche), empleando los cebadores CD247cd F y R, que adicionan al ADNc de *CD247* las dianas HindIII (5') y KpnI (3'). Para las mutaciones de codón de terminación prematuro, que generan las proteínas más cortas Q70X y Q101X, se utilizaron las parejas de cebadores CD247cd F-R2 y F-R3 respectivamente. Tras comprobar que el tamaño del producto amplificado era el correcto mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, éste se purificó con un kit de purificación de ADN a partir geles de agarosa (Biotools), y después se digirieron los extremos con las enzimas de restricción HindIII y KpnI (New England Biolabs). El plásmido pEGFP-N1 también se digirió con estas enzimas, se purificó y se unió a los insertos generados en el paso anterior utilizando la enzima T4 DNA ligasa (New England Biolabs).

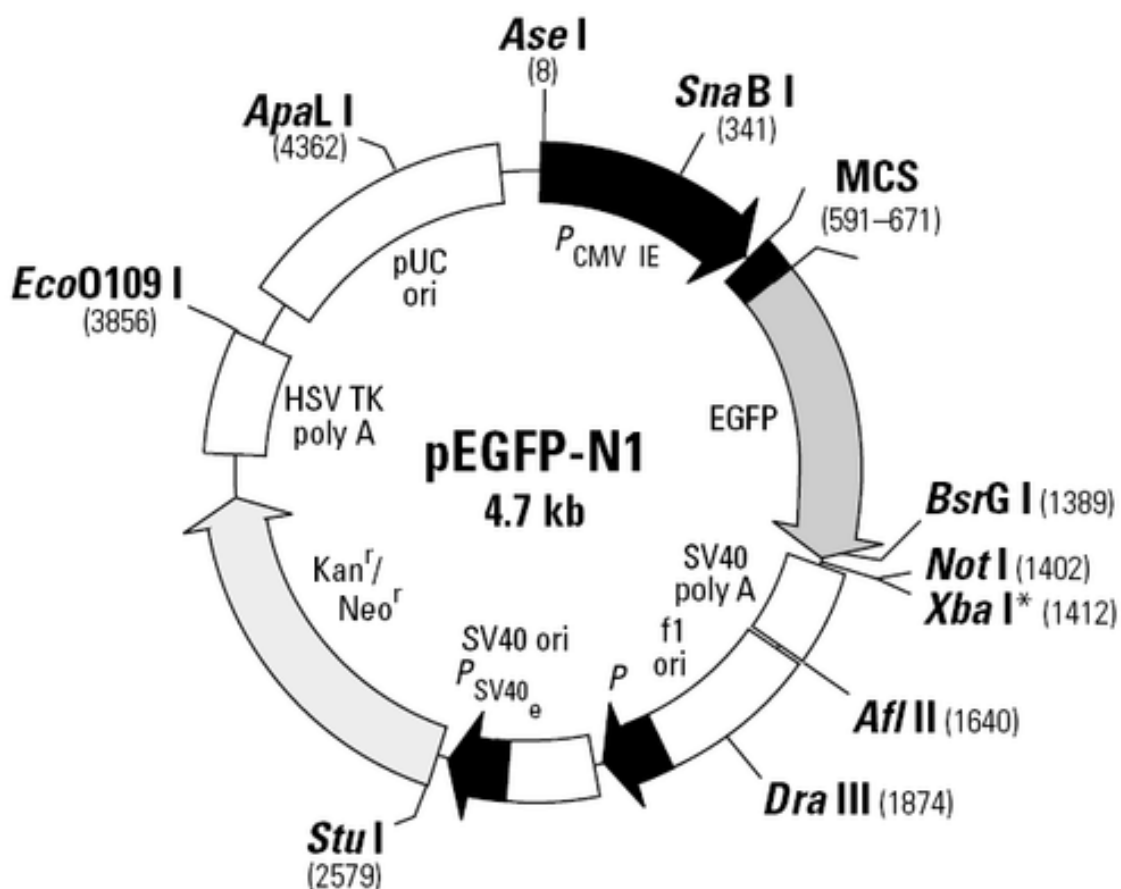
El volumen de la reacción de ligación se empleó para transformar las bacterias competentes DH5 $\alpha$  (NZYTech) en medio SOC por choque térmico a 42°C. Las bacterias se sembraron en placas de LB-agar con kanamicina 50  $\mu$ g/ml (Sigma Aldrich) a 37°C durante toda la noche. Se seleccionaron 5 colonias por clonaje para comprobar si expresaban el plásmido correctamente clonado mediante una PCR de colonias de bacterias con los cebadores específicos.

Si las colonias resultaban positivas, estas se cultivaban en 5 ml de medio LB-kanamicina líquido y, tras la incubación durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm), se aislaba el ADN plasmídico con el kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Los plásmidos fueron secuenciados con los cebadores internos del plásmido pEGFP en la unidad C.A.I. de Genómica y Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

Las mutaciones Q70L, Q70W y Q70Y, y la isoforma 1 de *CD247* (inserción de 3 pb) se generaron por mutagénesis dirigida con el kit de QuikChange II Site-directed mutagénesis kit (Agilent) y con el uso de los cebadores diseñados para generar la mutación correspondiente (**Tabla 5.1**). Una vez realizada la reacción,

se transformaron bacterias competentes y se seleccionaron de la manera ya descrita anteriormente.

Para la producción de una cantidad de plásmido adecuada para los experimentos, se crecieron las bacterias transformadas de cada clonaje en 200 ml de LB líquido y se purificó el plásmido con el kit QIAGEN Plasmid Maxi (QIAGEN).

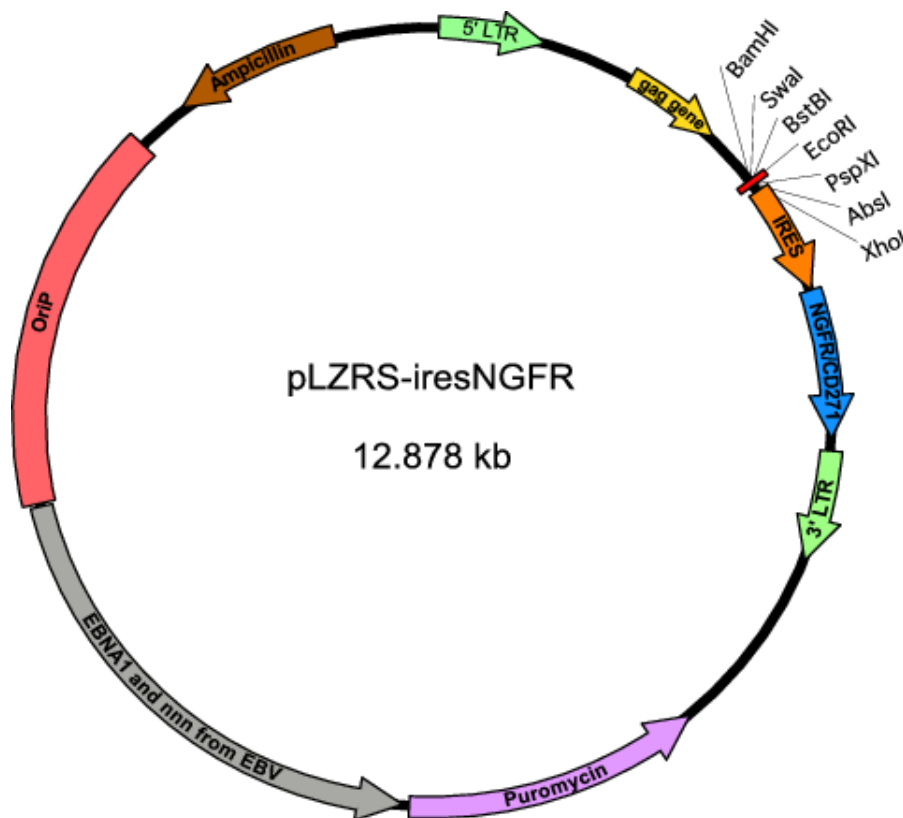


**Figura 5.1.** Mapa del plásmido pEGFP-N1 (Clontech).

### pLZRS

El plásmido pLZRS-iresΔNFGR es un plásmido de gran tamaño (aproximadamente 13 kpb) que presenta genes de resistencia a ampicilina para la transformación de bacterias, y a puromicina para transfectar de manera estable las células empaquetadoras con el objetivo de generar la partícula retroviral (**Figura**

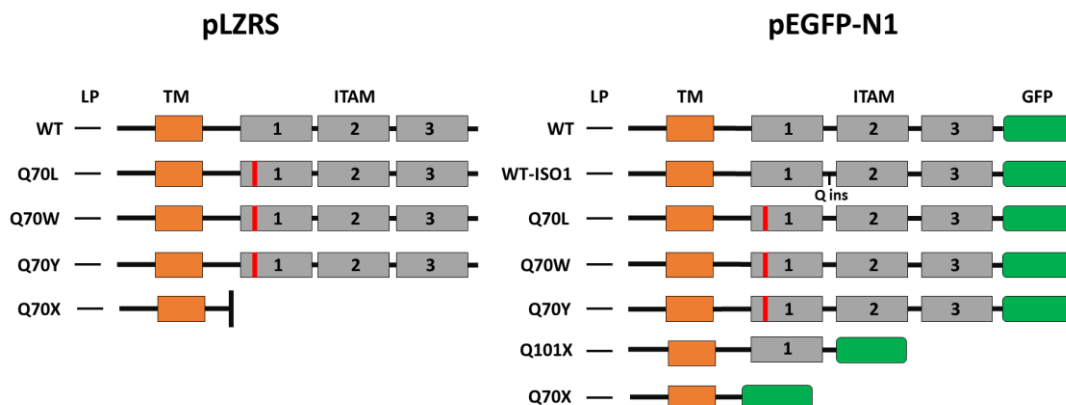
**5.2).** La secuencia localizada entre los dos LTR, será la única incorporada dentro del retrovirus, incluye la proteína gag del virus, y la región de clonaje múltiple donde ira el inserto y el gen NGFR (Receptor de neurotrofina o CD271) precedido de una secuencia IRES para que se traduzca de manera bicistónica respecto al inserto clonado. En este vector al gen NGFR se le deletiona su región intracelular ( $\Delta$ NGFGR) para que solo se exprese como marcador de la infección, pero no pueda señalizar (Martinez-Barricarte et al., 2016).



**Figura 5.2.** Mapa del plásmido retroviral pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR (Martínez-Barricarte et al. 2016).

Para clonar CD247 y las mutaciones ya generadas, se amplificaron los distintos constructos a partir de los plásmidos pEGFP-N1 con cebadores que flanquearan CD247 e incorporaran las dianas de restricción XhoI y EcoRI. El plásmido retroviral y los amplificados de interés fueron digeridos con las mismas enzimas. La ligación y el proceso de transformación de bacterias competes, su

selección y la verificación del plásmido se realizó como ya está descrito en el clonaje del vector pEGFP-N1.



**Figura 5.3.** Constructos CD247 generados y utilizados. Los constructos en el plásmido retroviral consistieron en la proteína CD247 y sus variantes sin ningún tipo de fusión adicional, mientras que los clonajes en el plásmido pEGFP-N1 se añadió una proteína GFP fusionada a los extremos C-terminal

## 5.2.-Líneas celulares y cultivos

Todas las líneas celulares empleadas en este trabajo se cultivaron en condiciones de esterilidad en un incubador a 37°C y al 5% de CO<sub>2</sub>.

La línea T **Jurkat** J77, derivada de leucemia linfoblástica aguda, se cultivó en medio RPMI 1640 (Lonza), suplementado con glutamina (Gibco) y antibiótico-antimicótico (Gibco), al 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco).

Las líneas HTLV-I son líneas celulares generadas a partir de la immortalización de linfocitos T (activados previamente con PHA) mediante cocultivo con líneas MT-2 productoras del virus HTLV-I (*Human T-Lymphotropic Virus I*), un retrovirus con tropismo por linfocitos T CD4. El resultado son líneas T linfoblásticas dependientes de IL-2 para su crecimiento. Estas líneas se cultivan en las mismas condiciones que las células Jurkat, y se les adiciona IL-2 recombinante a 100 U/ml (Dr. Craig W. Reynolds). La línea **PM1T** es una línea HTLV-I CD247 deficiente generada por nuestro grupo de investigación



anteriormente (Marin et al., 2017), a partir de un paciente con SCID y una mutación en homocigosis en el codón de inicio de *CD247*. La línea **BCL10def** fue obtenida a partir de un paciente con inmunodeficiencia combinada con la mutación de *splicing* c.57+1G>A en homocigosis en *BCL10*, sin que expresara ningún nivel de proteína. (Torres et al., 2014). En ambos casos se utilizó como control una línea HTLV-I derivada de un donante sano, generada a la vez que las de los pacientes. Tanto a la línea ZKO como BCL10def se les verificó la mutación del paciente de procedencia mediante la extracción de ADN genómico con el kit Nucleon BACC (GE Healthcare) para secuenciar el exón donde se encontrará la mutación en cada caso con cebadores específicos (**Tabla 5.1**).

La línea CD247 deficiente MA5.8 es un hibridoma T de ratón, derivado de la línea **2B4**. Ambas líneas fueron cultivadas en las mismas condiciones de cultivo que Jurkat con medio RPMI completo, adicionado suero al 5%.

Las líneas **Phoenix** se emplearon para el empaquetamiento de las partículas retrovirales. Esta línea deriva de células 293T, una línea adherente de células epiteliales de riñón humano, fácil de transfectar. Esta línea ya expresa de manera estable los dos plásmidos empaquetadores necesarios para la producción de retrovirus de segunda generación, cedidos por el Dr. Martínez Barricarte (Universidad Rockefeller, Nueva York, EE. UU.). Estas líneas se cultivaron en medio IMDM (Lonza) al 10% de FBS y con idénticas cantidades de glutamina y antibiótico que el resto de las líneas.

### 5.3.-Citometría de flujo

Para las tinciones de citometría de flujo se utilizaron entre 0,1 y 0,5 millones de células por tinción. Como solución de lavado se empleó tampón FACS. Las tinciones se realizaron en placas de 96 pocillos de fondo redondo, donde se efectuaron los lavados y las incubaciones. Las incubaciones con anticuerpos directos (**Tabla 5.2**) se realizaron en un volumen de 25 µl con el anticuerpo diluido en FACS a la concentración correspondiente durante 30 minutos, para después

realizar dos lavados consecutivos. Para el caso de tinciones intracelulares se empleó el kit Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set (eBiosciences).

Una vez finalizada la tinción, las células se transfirieron a tubos de citómetro y se pasaron por un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Biosciences). Los resultados se analizaron utilizando el programa FlowJo (TreeStar).

#### **5.4.-Estudios de activación**

Para los estudios de activación las células se plaquearon a 0,5 millones/ml en condiciones de reposo para reducir la activación basal que pudiesen tener. En el caso de las células HTLV-I, la condición de reposo consiste en medio RPMI completo al 10% FBS sin adicionar IL-2, y en el de las líneas Jurkat en RPMI al 1% suero.

Las estimulaciones se hicieron añadiendo 0,2 millones de células en 200  $\mu$ l en placas de 96 pocillos de fondo plano para estimulaciones de menos de 24 horas, y la misma cantidad de células en 0,5 ml en placa de 48 pocillos para estimulaciones de 48 horas. Para las estimulaciones con anti-CD3 se incubó previamente la placa a 4°C con el anticuerpo OKT3 adherido a placa a 10  $\mu$ g/ml en PBS (Gibco) el día anterior. El segundo estímulo empleado fue forbol-12-miristato- 13-acetato (PMA) a 10 ng/ml (Sigma-Aldrich), con ionomicina 1  $\mu$ M (Sigma-Aldrich).

En los experimentos de producción de citoquinas, las células se estimularon con PMA + ionomicina como ya hemos descrito, pero adicionando Brefeldina A (Sigma-Aldrich) a 10  $\mu$ g/ml a las 2 horas de la estimulación durante 6 horas más. La Brefeldina A es un inhibidor del transporte vesicular en Golgi que impide que las citoquinas producidas sean excretadas, lo que permite teñir intracelularmente las células con anticuerpos anti-citoquina. Pasado el tiempo de incubación, las células fueron fijadas y teñidas con el kit eBioscience™ IC Fixation Buffer.

## 5.5.-Transfección

Las transfecciones se realizaron mediante nucleofección, utilizando el equipo *Nucleofector*<sup>TM</sup> (Lonza). Para las líneas HTLV-I y Jurkat se utilizó el kit AMAXA<sup>®</sup> para líneas celulares V (Lonza), usando el programa X-001. En el caso de las líneas 2B4 y MA5.8, que tienen una eficiencia más baja, se usó el kit AMAXA<sup>®</sup> R y el programa R-014. Para la transfección, en todos los casos, se dejaron las células 24 horas antes a 0,5 millones/ml en medio de cultivo fresco. Para la nucleofección se emplearon 2 µg de plásmido y entre 1,5 y 5 millones de células por transfección (dependiendo de si se emplearían para citometría o *Western blot*, respectivamente). Una vez nucleofectadas, las células se dejaron rápidamente creciendo en 2 ml de medio completo atemperado y se espera entre 18 y 24 horas para realizar los análisis.

## 5.6.-Producción de partículas retrovirales

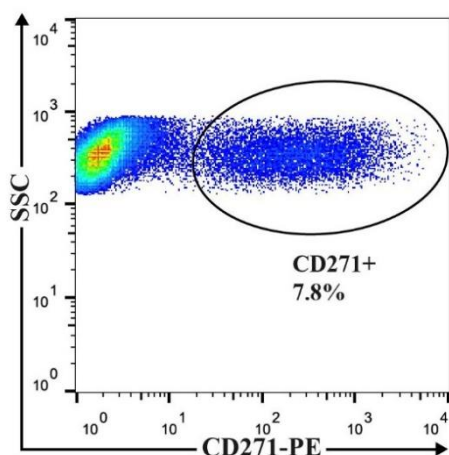
Para la transfección de las líneas Phoenix se empleó un flask de 75cm<sup>2</sup> confluyente al 90%, y se transfectaron 10 µg de plásmido usando el kit de transfección X-tremeGene9 (Roche), suplementado con OptiMeM-GlutaMax (Gibco). A las 24 horas, se adicionó al cultivo puromicina (InvivoGen) para seleccionar las células transfectadas. 72 horas después de la transfección se obtienen los sobrenadantes con partículas retrovirales y se pasan por un filtro de polietersulfona de 0,45 µm (Merck Millipore), para eliminar restos celulares.

## 5.7.-Transducción retroviral

Entre 0,2 y 0,4 millones de células HTLV-I, Control y PM1T, se incubaron con 0,75 ml de sobrenadante retroviral adicionado con polibreno (0,8 µg/mL, Sigma), un polímero catiónico que busca facilitar las interacciones virus-célula reduciendo cargas aniónicas, BX795 (0,6 µM, Invivogen), un inhibidor de TBK1

(señalización de TLR3) para aumentar la eficacia de la transducción evitando respuestas antivirales de la célula e IL-2 (Sutlu et al., 2012) (10.000U/ml).

El volumen final se separó en cantidades de 150  $\mu$ l y se repartió en placas de 96 pocillos de fondo cónico, donde fueron centrifugadas 1 hora a 900 rpm a RT y se mantuvo en cultivo sin cambiar el medio durante 6 horas. Después, se descartó la mezcla de infección y se dejó crecer el tiempo suficiente para su recuperación y expresión del virus en medio RPMI completo con IL-2. Una vez las células se estabilizan se analizan por citometría de flujo seleccionando por el marcador CD271) (**Figura 5.4**).



**Figura 5.4.** Transducción por retrovirus en líneas HTLV-I. Selección por citometría de flujo de células transducidas mediante tinción con anticuerpo anti-CD271.

## 5.8.-CRISPR/Cas9

Para generar las líneas Jurkat deficientes para los genes CD247 y BCL10 se procedió a la edición genómica mediante CRISPR/Cas9 usando la enzima Alt-R® CRISPR-Cas9 (IDT). Se escogieron guías crRNA específicas para cada gen cuya secuencia de corte por la Cas9 estuviese lo más cerca posible al codón de inicio (**Tabla 5.1**).

En primer lugar, se hibridaron en proporción 1:1, las guías crRNA:tracrRNA a una concentración 44  $\mu$ M. A continuación se ensambló el complejo ribonucleoproteína RNA/Cas9 (RNP), mediante la hibridación de la

proteína Cas9 a una concentración de 22  $\mu$ M, junto con 22  $\mu$ M del dúplex crRNA:tracrRNA en proporción 1:1, y un volumen final de 10  $\mu$ l.

Las células Jurkat creciendo en condiciones óptimas en fase de confluencia fueron transfectadas con 10  $\mu$ l del complejo RNP por electroporación con el kit de transfección del sistema de electroporación Neon (ThermoFisher). Se electroporaron 100.000 células por triplicado y se dividió para su cultivo cada electroporación en 4 pocillos p96w. A medida que fueron creciendo las células, se obtuvieron lisados celulares para la evaluación del silenciamiento del gen.

En el caso de la edición de la línea CD247 deficiente, se pudo evaluar por citometría extracelular que su deficiencia afecta al nivel de expresión del TCR. De esta manera se pudo aislar las células CD3 negativas con metro separador-analizador FACS Aria III (Becton Dickinson) en el C.A.I. de Citometría y Microscopia de Fluorescencia de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Para seleccionar clones, se procedió a una dilución límite donde se sembró en placas de 96 pocillos de fondo redondo células a una concentración de 5 células/pocillo en la primera dilución y 0,3 células por pocillo en una dilución posterior. Una vez crecieron las líneas CD247 deficiente (ZKO) y BCL10 deficiente y heterocigota (-/- y +/-), se extrajo ADN genómico para amplificar con oligonucleótidos que flanquearan la región de la edición (**Tabla 4.1**) y se secuenció.

## **5.9.-Lisados celulares**

Antes de ser lisadas, las células fueron lavadas dos veces en PBS. A continuación, fueron resuspendidas en el tampón de lisis RIPA (ThermoScientific), suplementado con NaF (1M), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (1M), M PMSF (0,2M) (Sigma-Aldrich), y un cóctel de inhibidores de proteasas (1:1000) (Calbiochem). Se dejaron incubando 30 minutos a 4°C y finalmente, se sonicaron durante 30 segundos.

Los lisados fueron cuantificados mediante la técnica de Lowry con el kit Lowry DC *protein Assay* (BIO-RAD), usando como recta patrón una disolución en tampón RIPA de BSA (Sigma Aldrich) de 0 a 5 mg/ml.

### **5.10.-Western blot**

Se emplearon entre 20 y 40 mg de lisado celular, dependiendo del experimento, que se mezclaron con el tampón reductor Laemmli y con  $\beta$ -mercaptotanol (Sigma-Aldrich). Posteriormente, los lisados se incubaron a 95°C durante 5 minutos y se cargaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Se separaron las proteínas por electroforesis (a 100V)). Para distinguir los tamaños celulares junto a los carriles de los lisados celulares, se añadió el marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor (Thermofisher).

La electroforesis se transfirió en condiciones semihúmedas a una membrana de di-fluoruro de polivinilideno (PVDF, Merck Millipore) a 25 V durante 15 minutos en una unidad de transferencia Trans-Blot Turbo (BIO-RAD). La membrana se incubó en solución de bloqueo para Odyssey® (LI-COR) diluida 1/2 en TBS a RT durante 2 horas y, posteriormente, se incubó ON con el anticuerpo primario (**Tabla 4.2**) en TBS con solución de bloqueo al 10%. Al día siguiente, se lavó con tampón TBS y con Tween 20 (Sigma-Aldrich) al 0,2% durante 10 minutos 3 veces consecutivas. Después, se incubó el anticuerpo secundario unido a moléculas fluorescentes. Tras ser lavada de nuevo, la membrana se visualizó con un equipo Odyssey® Fc. Las imágenes resultantes se analizaron mediante el programa informático LI-COR.

La composición de todas las disoluciones y tampones utilizados se encuentran en la **Tabla 5.3**.

### **5.11.-Análisis estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa GraphPad prism comparando grupos de datos mediante test paramétrico T-Student tras comprobar la normalidad de los datos mediante una prueba de Kormogorov-Smirnov.

---

## **6.-Resultados**

---



-

## 6.1.-CD247

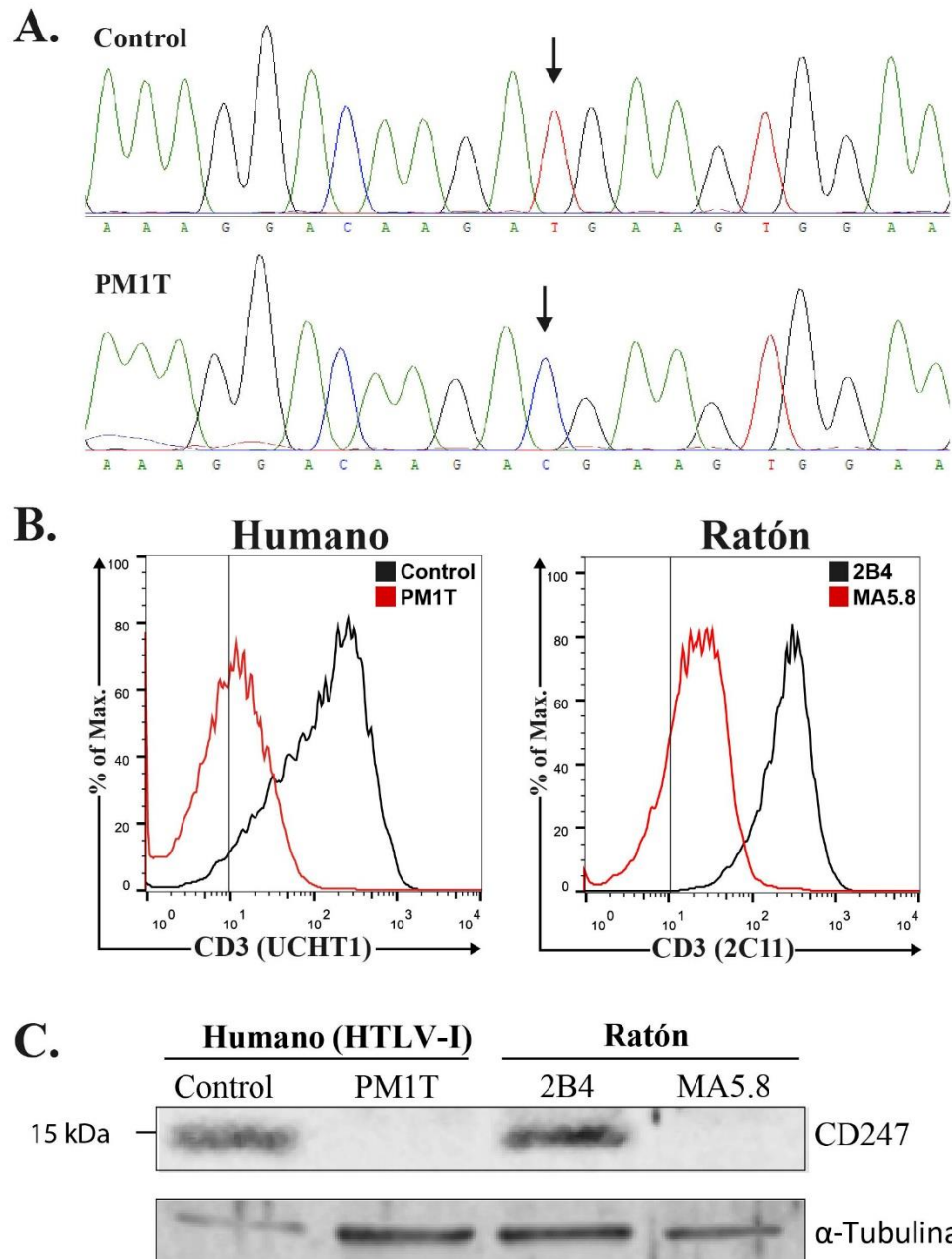
Para estudiar cómo se comportan las mutaciones somáticas y su capacidad de reversión, y el impacto que puedan tener mutaciones germinales que puedan actuar como dominante negativo, generamos distintas estrategias para generar un modelo que nos permita evaluar las mutaciones en CD247 sobre la expresión del TCR. Empleamos la línea de ratón históricamente empleada y dos nuevas líneas, una derivada de un paciente CD247, y otra generada a partir de líneas Jurkat mediante CRISPR. Y realizamos técnicas de transfección y transducción para reconstituir.

### 6.1.1.-Caracterización de las líneas humana (PM1T) y múrida (MA5.8) deficientes en CD247

En primer lugar, se caracterizó la línea de linfocitos T PM1T, derivada de un paciente con deficiencia de CD247 (Marin et al., 2017) e inmortalizada mediante infección con el virus linfoblástico HTLV-I. La línea PM1T fue denominada en referencia a la mutación causante del defecto de expresión de CD247 (c.2T>C; p.M1T; rs672601318).

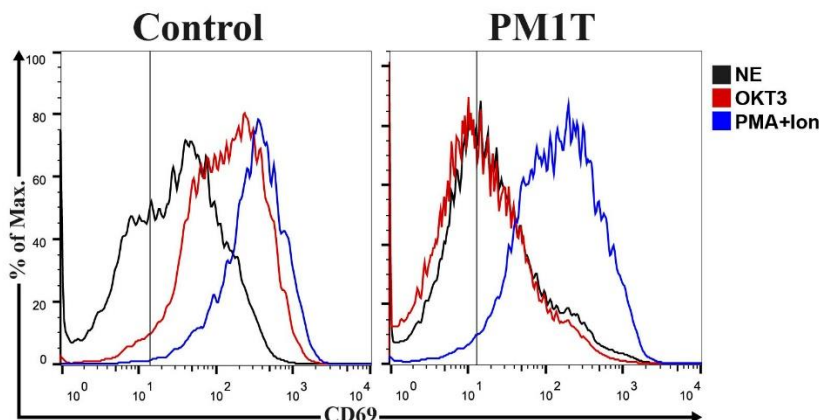
Debido a que hasta el momento no se disponía de una línea humana carente de expresión superficial del TCR, se decidió utilizar como controles experimentales las líneas T múridas MA5.8, deficiente en CD247, y su hibridoma parental, 2B4 (Sussman et al., 1988); empleadas tradicionalmente para experimentos de reconstitución del TCR (Beck-Garcia et al., 2015; Zhang et al., 2011) El análisis por *Western blot* de las líneas PM1T y MA5.8 demostró en ambas la ausencia total de expresión de CD247 (**Figura 6.1**). Los ensayos de cuantificación de la expresión superficial del TCR por citometría de flujo demostraron que las células PM1T, al igual que en el paciente del cual proviene la línea, presentaban un defecto muy marcado de expresión de CD3/TCR, en torno a un 4% del nivel normal. Los experimentos realizados en las líneas múridas

mostraron que MA5.8 presentaba una deficiencia de CD3 en superficie menos acusada (alrededor de un 8-10%).



**Figura 6.1. Caracterización de las líneas T deficientes en CD247, PM1T y MA5.8.** (A) Electroferograma de la secuenciación de la línea PM1T que confirma la mutación c.2T>C en homocigosis. (B) Caracterización por citometría de flujo de la expresión de CD3 extracelular en las líneas PM1T y MA5.8 (histogramas rojos) frente a sus respectivas líneas control (histogramas negros). La línea vertical representa el control de isotipo. (C) *Western blot* de lisados de las líneas HTLV-I control, PM1T, 2B4 y MA5.8 en el que se observa el defecto completo de expresión de CD247 en las líneas PM1T y MA5.8.

A nivel funcional, observamos que la línea PM1T era incapaz de inducir la expresión de CD69 post-estimulación del TCR con anti CD3, mientras que sí respondía a estímulos independientes del TCR como PMA + ionomicina, (**Figura 6.2**).

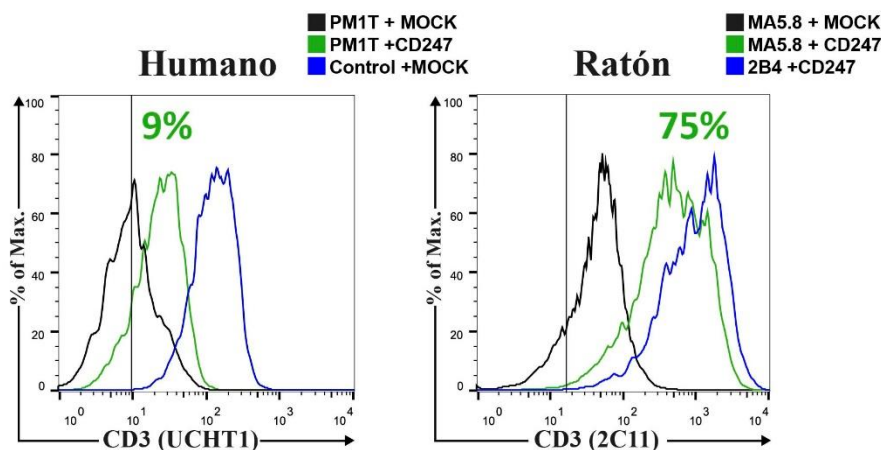


**Figura 6.2. Defecto funcional de las células PM1T.** Las células de las líneas HTLV-I, control y PM1T, fueron incubadas durante 18 horas en presencia de diferentes estímulos y se evaluó la inducción de la expresión de CD69 por citometría de flujo. La línea vertical representa el control de isotipo. NE= No estimulado; OKT3= anti-CD3 pegado a placa; PMA+Ion = PMA e ionomicina.

#### 6.1.2.-Reconstitución de la expresión del TCR en las líneas deficientes en CD247 mediante transfección de CD247 WT

Como estrategia inicial, transfectamos CD247 WT en las líneas T humanas HTLV-I (PM1T y control) y de ratón (MA5.8 y 2B4). Para ello, se clonó, dentro del vector pEGFP-N1 la isoforma 2 de CD247 WT, de 163 aminoácidos y mayoritaria en linfocitos T (Atkinson et al., 2003), fusionada a una proteína fluorescente EGFP (referida como GFP) en su extremo C-terminal.

Al transfectar CD247 WT en la línea PM1T, observamos un aumento de la expresión de CD3 en superficie muy bajo, aunque sí cuantificable, comparado con el resultado de transfectar el plásmido vacío que no alteraba la expresión de CD3 (9% vs 4%, respectivamente). En contraste, la reconstitución con CD247 WT en la línea de ratón MA5.8 incrementó la expresión del TCR en superficie hasta un 75% en comparación con la línea parental 2B4 (**Figura 6.3**).



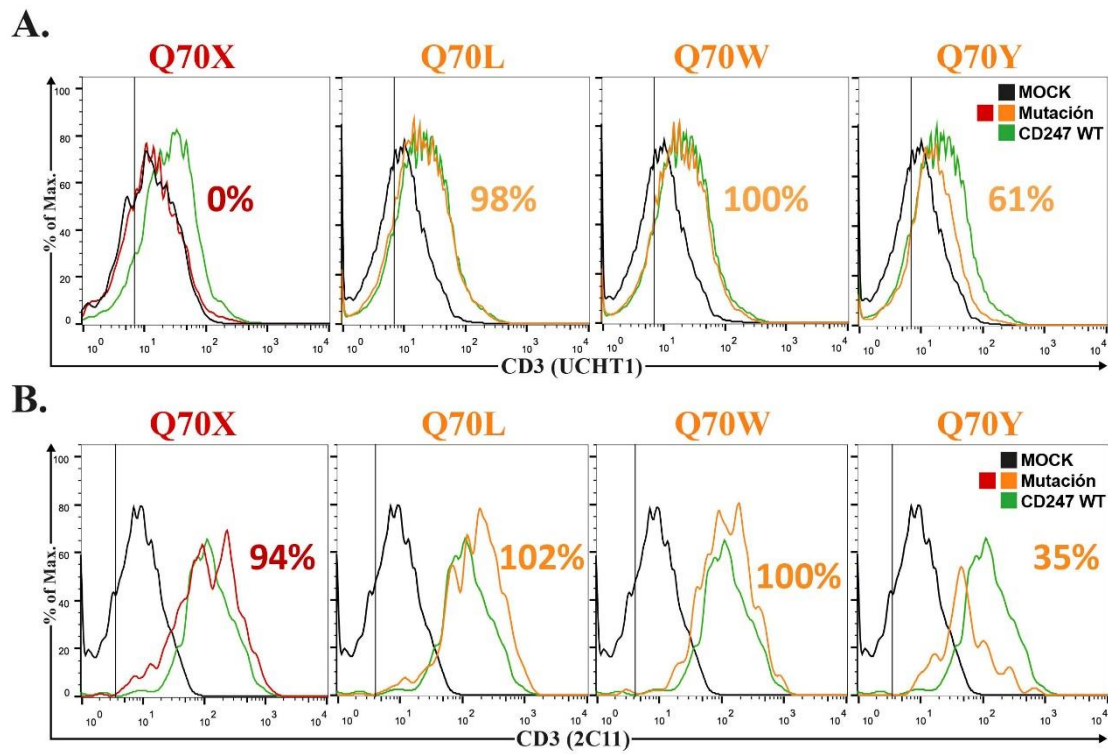
**Figura 6.3. Reconstitución superficial del TCR mediada por CD247 WT.** Las líneas deficientes en CD247 se transfectaron con el constructo CD247 WT-EGFP (histogramas verdes) y con el plásmido vacío, MOCK, (histogramas negros). Células control (histogramas azules) se transfectaron con MOCK en humano y con CD247 WT en ratón. Los valores indican el porcentaje de expresión del TCR en las líneas deficientes transfectadas con CD247 WT respecto a las líneas control. Las células humanas fueron teñidas con el anticuerpo anti-CD3 clon UCHT1 y las de ratón con el anti-CD3 clon 2C11. La línea vertical representa el control de isotipo.

### 6.1.3.-Reconstitución comparativa de mutaciones somáticas vs. WT

Una vez observamos que la línea PM1T funcionaba como modelo para evaluar el impacto de las mutaciones de CD247 sobre los niveles del TCR decidimos usarlas para analizar el efecto de las mutaciones somáticas descritas en dicho gen. Para esto, se escogieron las mutaciones del paciente descrito por Rieux-Laucat (Rieux-Laucat et al., 2006): una mutación germinal (Q70X) y 3 somáticas (Q70L, Q70W y Q70Y) capaces de revertir el defecto. Estas mutaciones se clonaron de igual manera que CD247 WT en el vector pEGFP-N1

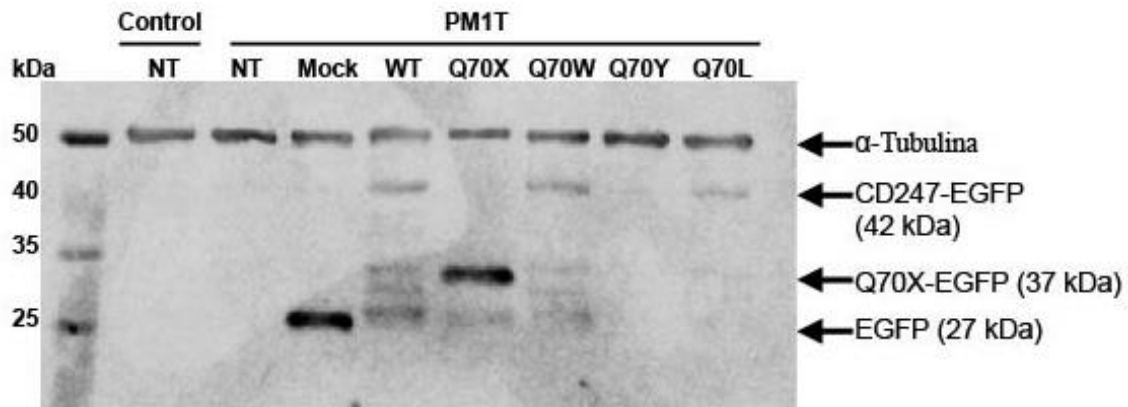
Al transfectar la línea PM1T con la mutación Q70X, que elimina toda la región citoplasmática de CD247, no se observó aumento de los niveles de expresión del CD3 en superficie. Respecto a las mutaciones somáticas, Q70L y Q70W reconstituyeron al mismo nivel que la proteína WT; mientras que la mutación Q70Y reconstituyó de forma parcial (35% respecto a WT) y con menor eficiencia de células GFP<sup>+</sup> (**Figura 6.4 A**). Al repetir estos los experimentos en el modelo de la línea MA5.8 las mutaciones somáticas se comportaron de igual

manera que en las PM1T, pero no así Q70X, que reconstituía la expresión del TCR de manera completa. (**Figura 6.4 B**).



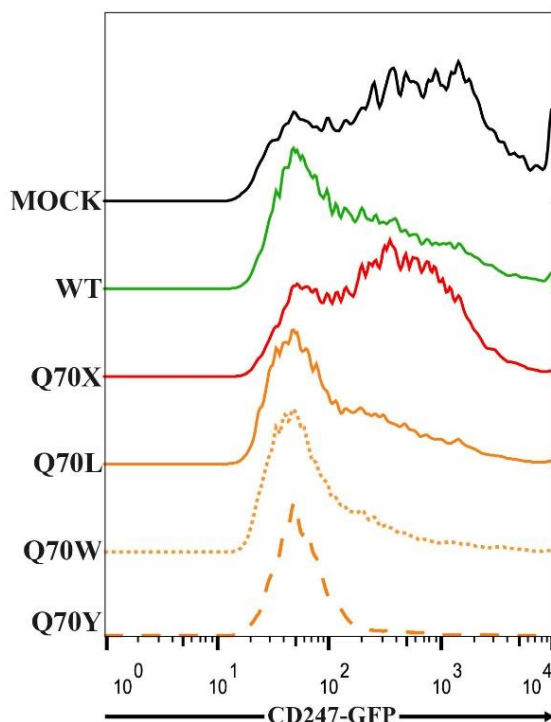
**Figura 6.4. Papel de las mutaciones somáticas en la restauración de la expresión del TCR en las líneas deficientes.** Se transfectaron los constructos CD247-GFP con la mutación germinal Q70X (rojo) frente a las mutaciones somáticas Q70L, Q70W, y Q70Y (naranja), MOCK (negro) y se compararon frente a la reconstitución del TCR con CD247 WT (Verde). La línea vertical representa el control de isotipo. Los números representan el porcentaje de reconstitución respecto a la proteína WT. (A) Humano (B) Ratón.

El análisis por *Western blot* de las líneas PM1T transfectadas con las diferentes construcciones hizo evidente que la proteína CD247-GFP se expresa peor cuando presenta la sustitución Q70Y (**Figura 6.5**) y el análisis *in silico* atribuyó a esta variante un posible efecto patogénico (PolyPhen score: 0.92).



**Figura 6.5. Análisis de expresión de las construcciones de CD247 en el vector pEGFP-N1.** Western Blot realizado a partir de lisados de las líneas HTLV1, PM1T y control, transfectadas con los diferentes constructos de CD247-GFP. La membrana fue revelada con anticuerpos anti-GFP y anti-  $\alpha$ tubulina. NT= No transfectado.

El perfil de expresión de GFP, que está directamente relacionado con la expresión de la cadena CD247, era visiblemente diferente entre la proteína WT y las mutaciones somáticas Q70L y Q70W respecto a la mutación germinal Q70X, que se asemejaba más a la transfección de MOCK (**Figura 6.6**).



**Figura 6.6. Patrón de fluorescencia de las variantes de CD247 fusionadas a GFP.** Comparación mediante citometría de flujo del perfil de fluorescencia de los distintos constructos CD247-GFP transfectados en la línea PM1T.

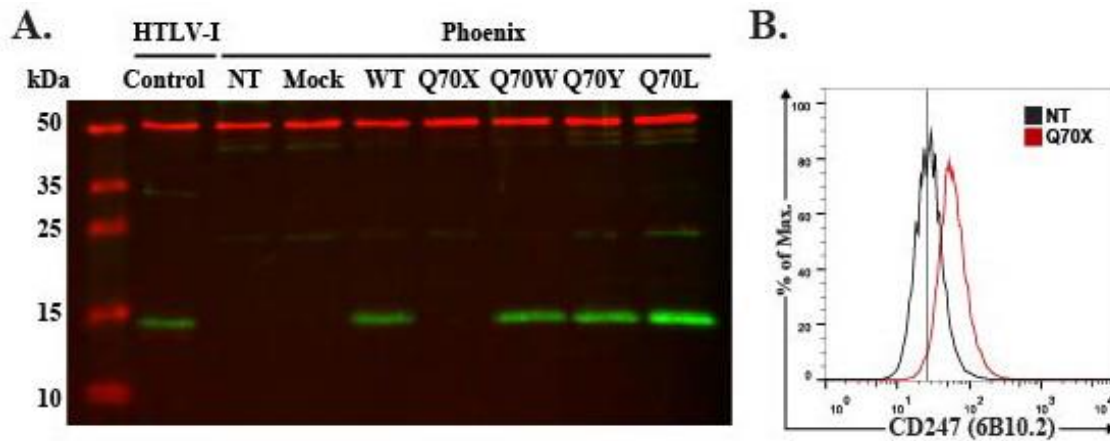
De estos datos podemos concluir que la línea humana PM1T es un modelo más apropiado que la línea murina MA5.8 para estudiar el efecto de las deficiencias de la cadena CD247 sobre la expresión del TCR, ya que no se comportan de la misma manera ante la mutación Q70X, que en el paciente causaba un defecto de expresión de CD3 en superficie (Rieux-Laucat et al., 2006). Los resultados obtenidos también nos demuestran que las mutaciones somáticas consideradas como revertientes no actúan de igual manera en la restauración de los niveles del TCR.

#### **6.1.4.-Ensayos de reconstitución del TCR mediante transducción retroviral**

Para mejorar la eficiencia de reconstitución en las líneas HTLV-I pasamos a un sistema de transducción retroviral. Para ello clonamos todos los constructos sin la fusión a proteína GFP en el plásmido bicistrónico retroviral pLZRS-IRES- $\Delta$ NGFR (Martinez-Barricarte et al., 2016) Este sistema retroviral expresa como marcador de infección el receptor CD271 (receptor de neurotrofina) truncado para que no señalice ( $\Delta$ NGFR).

En primer lugar, se transfectaron las líneas empaquetadoras Phoenix con los diferentes constructos y las células estables se seleccionaron mediante su resistencia a puomicina. Una vez estables, comprobamos que las diferentes variantes de CD247 se expresaban correctamente mediante *Western blot* (**Figura 6.7 A**). La expresión de la mutación germinal Q70X no pudo ser comprobada por esta técnica dado que el anticuerpo usado (448) reconoce la región C-terminal, que es precisamente la región que se pierde a causa del codón de parada prematuro. Una tinción por citometría de flujo intracelular usando el anticuerpo anti CD247 6B10.2 confirmó que el constructo Q70X se expresaba adecuadamente (**Figura 6.8 B**).

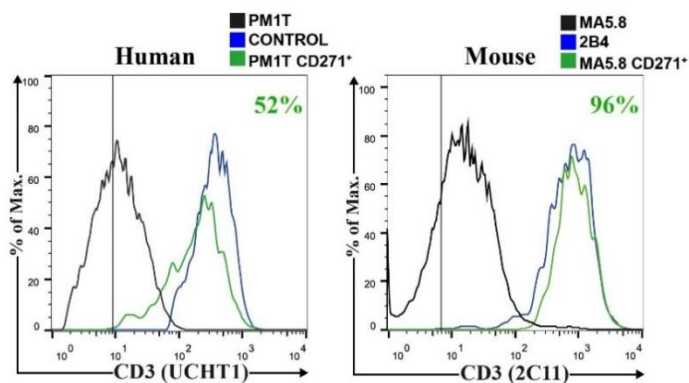




**Figura 6.7.** Comprobación por *Western blot* de la correcta expresión de las construcciones de CD247 en el vector retroviral. (A) *Western Blot* con lisados de las líneas empaquetadoras Phoenix que transfectedas con las diferentes variantes de CD247. La tinción se realizó con el anticuerpo anti-CD247 448 (verde) y anti- alfa tubulina. NT= No transfectado. (B) Tinción por citometría de flujo de células Phoenix transfectedas con la mutación Q70X (Rojo) y MOCK (negro) teñidas con el anticuerpo anti CD247 clon 6B10.2. La línea vertical representa el control de isotipo.

Una vez comprobamos que los constructos del retrovirus se expresaban correctamente se procedió a transducir las líneas inmortalizadas PM1T y control.

La reconstitución del TCR por transducción de CD247 WT fue más eficiente en la línea PM1T que la transfección, restaurando los niveles de expresión de CD3 extracelulares a niveles más cercanos a los de la línea control, pasando del 9% de la transfección al 52%. La reconstitución de CD3 fue completa en la línea MA5.8 transducida (**Figura 6.8**).



**Figura 6.8. Transducción retroviral de CD247 WT.** Las líneas PM1T y MA5.8 fueron transducidas con el retrovirus portador de la secuencia de CD247 WT. Se analizó la expresión de CD3 en superficie de las células CD271<sup>+</sup>. La línea vertical representa el control de isotipo.

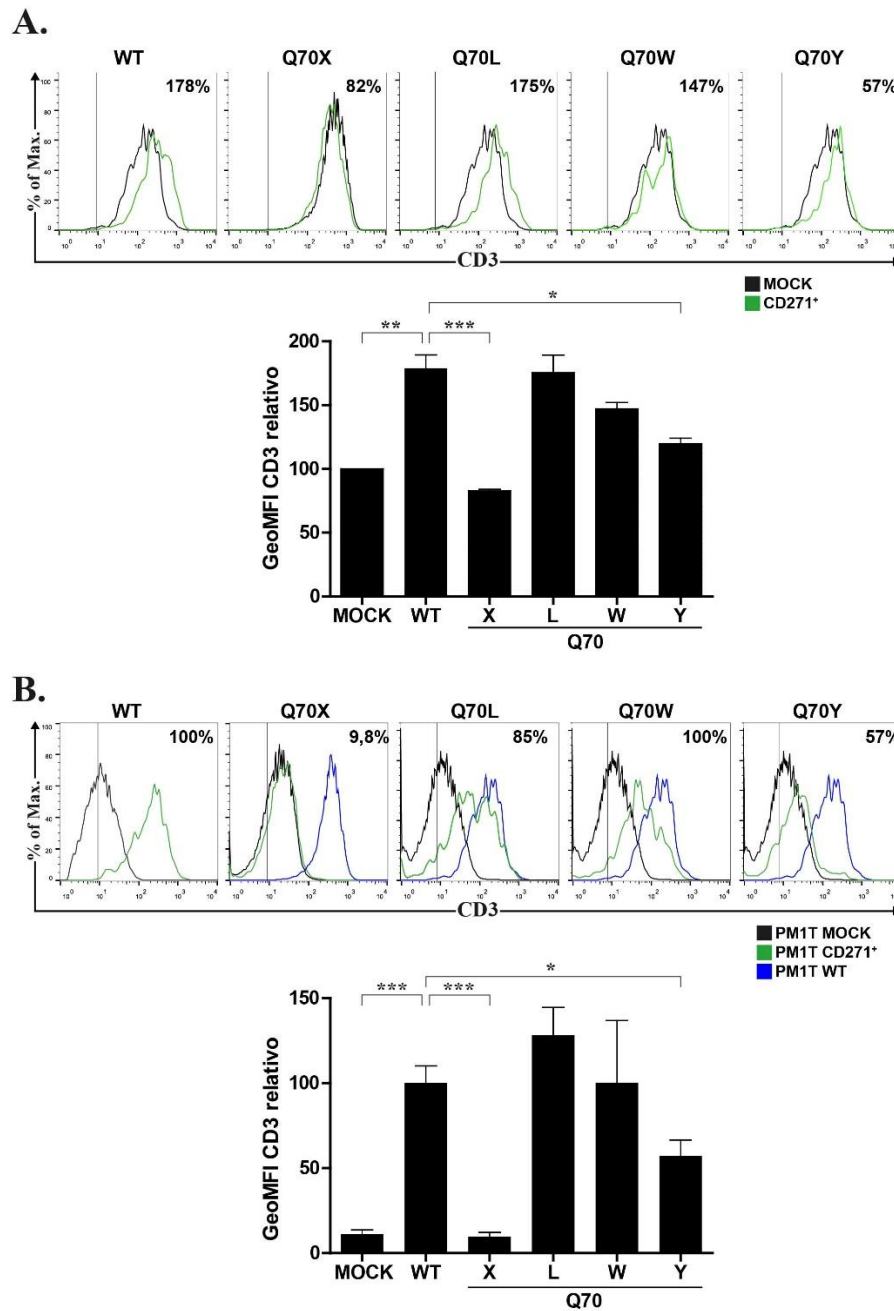
#### **6.1.5.-Reconstitución de mutaciones en *CD247* por transducción retroviral**

En la línea PM1T, la mutación Q70X no fue capaz de reconstituir la expresión de CD3 en superficie. La transducción de las mutaciones somáticas Q70L y Q70W reconstituye al mismo nivel que la proteína WT; sin embargo, Q70Y solamente recuperó la expresión del TCR un 57 %. Estos datos coinciden con los resultados obtenidos inicialmente en las transfecciones. La sobreexpresión de CD247 en líneas con niveles endógenos normales (HTLV-I control) hizo que la expresión del TCR medido como CD3 aumentara de forma significativa (178% de expresión respecto a MCOK). Las mutaciones somáticas mostraron el mismo patrón que en las células deficientes (Q70L/W similar a WT y Q70Y más bajo), y la mutación germinal Q70X actuó como dominante negativa bajando la expresión de CD3 respecto a MOCK. (**Figura 6.9**).

#### **6.1.6.-Generación de una línea T Jurkat deficiente de *CD247***

Con el objetivo de mejorar los resultados de eficiencia de reconstitución obtenidos con las células HTLV-I, decidimos generar mediante edición génica con la tecnología de CRISPR/Cas9 una línea T Jurkat deficiente en CD247 (ZKO). Para ello, electroporamos la proteína Cas9 conjugada con las guías específicas diseñadas para *CD247*, y posteriormente fueron seleccionadas por citometría con de *sorter* las células CD3<sup>-</sup> y por dilución límite se aislaron los diferentes clones (**Figura 6.10 A**).

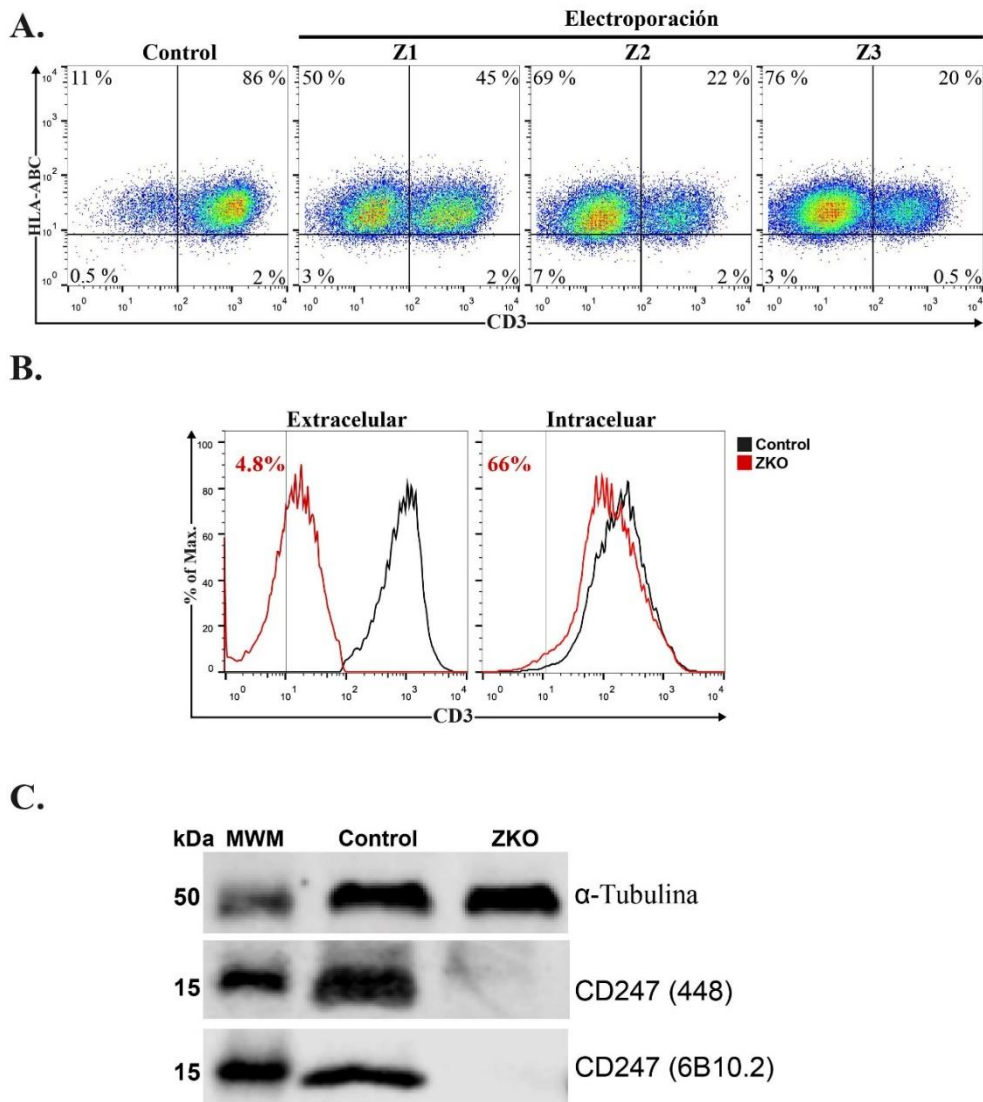
La línea ZKO resultante, que portaba la mutación en homocigosis c.237\_238insG que rompe el marco de lectura e impide la síntesis de CD247. Esta línea presentaba un fenotipo idéntico a las líneas HTLV-I.



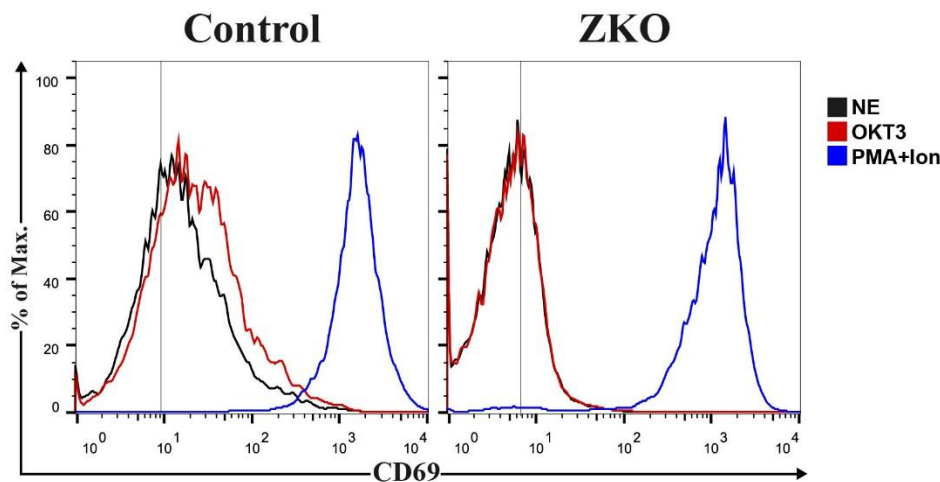
**Figura 6.9. Impacto de las mutaciones de CD247 en la expresión del TCR.** Se transdujeron HTLV1 control (A) y PM1T (B). Arriba los histogramas de las células CD271+. La línea vertical representa el control de isotipo. Abajo la cuantificación de los niveles de expresión de CD3. La línea control está normalizada respecto a la transducción con MOCK y la línea PM1T respecto a CD247 WT. \*p-valor <0,05; \*\*p-valor <0,01. \*\*\*p-valor <0,001.

Por citometría de flujo constatamos que estas células Jurkat expresaban niveles prácticamente negativos de CD3 en superficie, y a nivel intracelular mostraban una bajada de la expresión de CD3 $\epsilon$  en torno al 66%. (**Figura 6.10 B**).

Por *Western blot* confirmamos que esta línea no expresaba CD247 (**Figura 6.10 C**). Analizamos la inducción de CD69 vía TCR mediante la incubación con anticuerpos anti-CD3 y vimos que no era capaz de inducir la expresión de CD69, aunque si a estímulos independientes del TCR como PMA + Ionomicina (**Figura 6.11**). Por tanto, la pérdida de expresión de TCR en superficie también se tradujo a nivel funcional.



**Figura 6.10. Edición genética de *CD247*.** Se electroporaron por triplicado células Jurkat. Una semana después de la electroporación Se observó por citometría extracelular la eficiencia de la edición por el porcentaje de células con niveles bajos de CD3. (A). Tras la selección mediante citometría de *sorter* del cultivo Z3 y posterior dilución límite se obtuvo el clon ZKO y se cuantificó el defecto de expresión de CD3 extra e intracelular por citometría. La línea vertical representa el control de isotipo. (B). Se obtuvieron lisados celulares y se analizó por *Western blot* el defecto en expresión de CD247 (B).

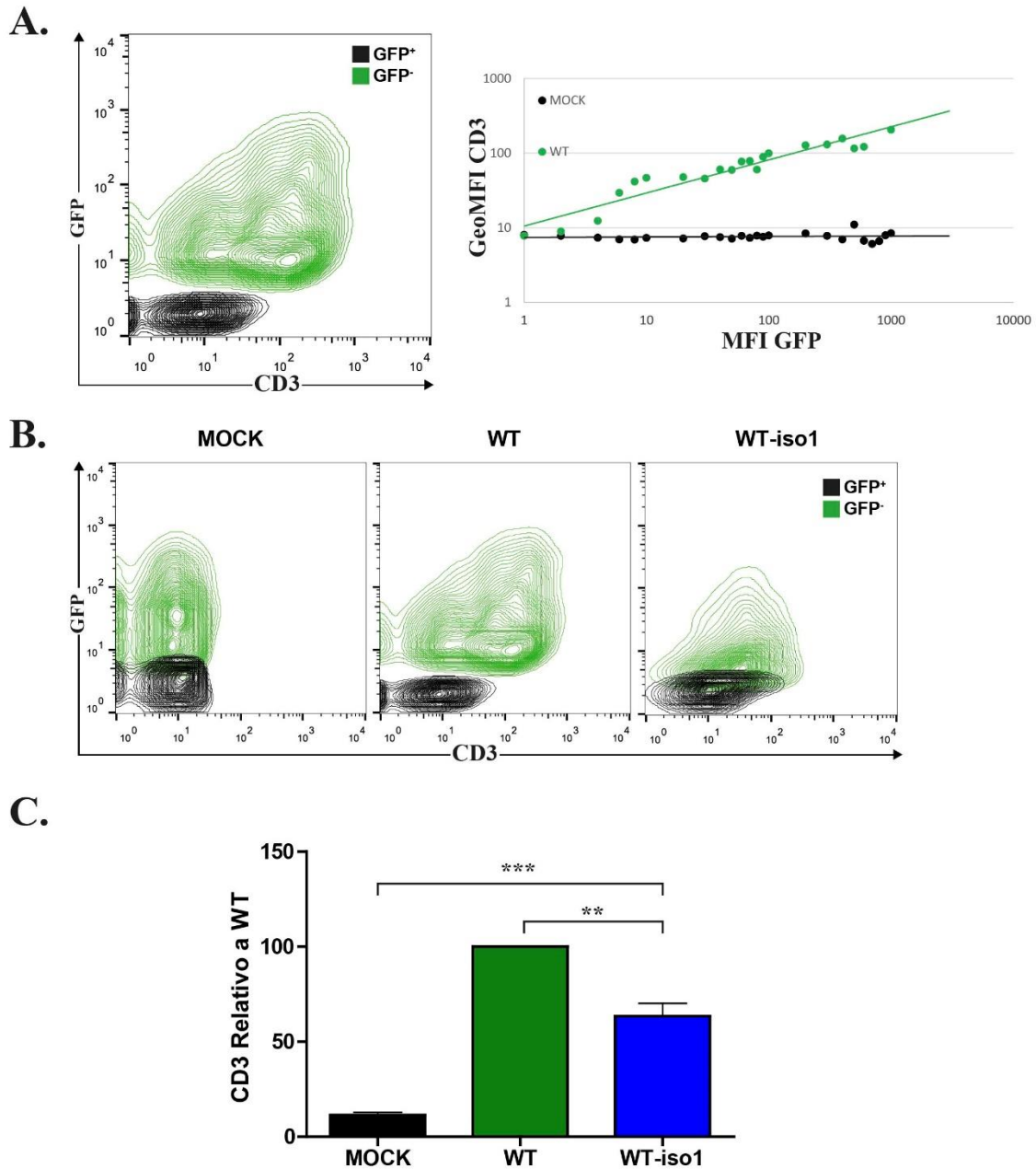


**Figura 6.11. Defecto funcional de las células ZKO.** Las células fueron incubadas durante 24 horas en presencia de OKT3 y PMA+ Ion y se evaluó la inducción de CD69 por citometría de flujo. NE= No estimulado; OKT3= anti-CD3 pegado a placa; PMA+Ion = PMA e ionomicina. La línea vertical representa el control de isotipo.

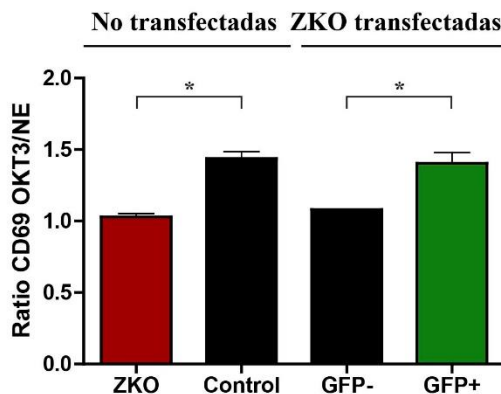
#### 6.1.7.-Reconstitución del TCR con CD247 WT en la línea ZKO

Para evaluar la capacidad de reconstitución de la línea ZKO, ésta fue transfectada con las diferentes construcciones de CD247 fusionadas a GFP. La transfección de CD247 WT incrementaba la expresión de CD3 en superficie de forma proporcional a la cantidad de GFP que expresaba la célula (**Figura 6.12 A**). En esta línea transfectamos también la isoforma 1 de CD247 (164 aminoácidos), y observamos que reconstituye de manera menos eficiente que la isoforma 2 (63%) (**Figura 6.12 B y C**). Las células ZKO reconstituidas con CD247-WT son funcionales e inducen CD69 al mismo nivel que células Jurkat control al ser estimuladas vía TCR (**Figura 6.13**).

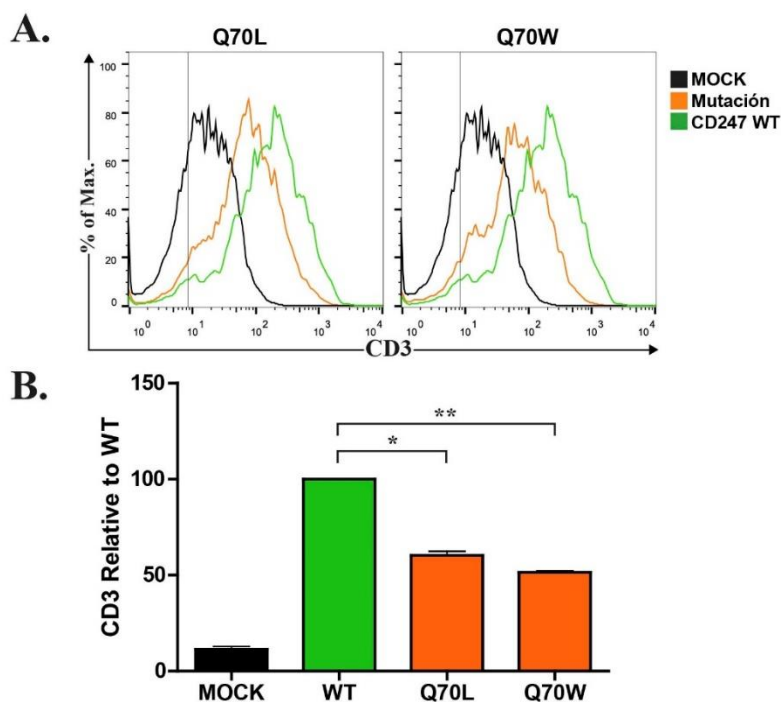
La transfección de las mutaciones somáticas Q70L y Q70W en este modelo no reconstituía con la misma eficiencia que la WT, sino inferior (60% y 51%, respectivamente) (**Figura 6.14**). La eficacia de la transfección con Q70Y fue muy baja, al igual que en las transfecciones en HTLV-I, lo que no permitió analizar su eficacia en este caso.



**Figura 6.12. Reconstitución del TCR.** Se transfeció la línea ZKO con los constructos CD247 WT-GFP, isoformas 2 (WT) y 1 (WT-iso1), y MOCK. (A) Transfección de CD247 WT en la línea ZKO (izquierda) y su representación lineal de la expresión de CD3 y GFP (derecha). (B) Transfección de CD247 WT y WT-Iso1 (C) y su cuantificación de expresión de CD3 en superficie relativo a la transfección CD247 WT. La línea vertical representa el control de isotipo. \*\*p-valor <0,01. \*\*\*p-valor <0,001.



**Figura 6.13. Reconstitución funcional de la línea ZKO.** Células Jurkat control y ZKO sin transfectar, y células ZKO transfectadas con CD247 WT 18 horas antes, fueron incubadas durante 24 horas con anti CD3 (OKT3) pegado a placa y se evaluó la inducción de CD69 por citometría de flujo. En las células transfectadas se analizó por separado la MFI de CD69 dentro de las ventanas GFP positivas y negativas. Se normalizó cada dato a la GeoMFI de CD69 en células sin estimular. \*p-valor <0,05.



**Figura 6.14. Efecto de las mutaciones somáticas en el TCR.** Se transfectó la línea ZKO con los constructos CD247-GFP (WT, Q70L y Q70W) y MOCK. La línea vertical representa el control de isotipo (A). Cuantificación de la expresión de CD3 en superficie relativo a la CD247 WT en la línea ZKO (B). \*p-valor <0,05. \*\*p-valor <0,01.

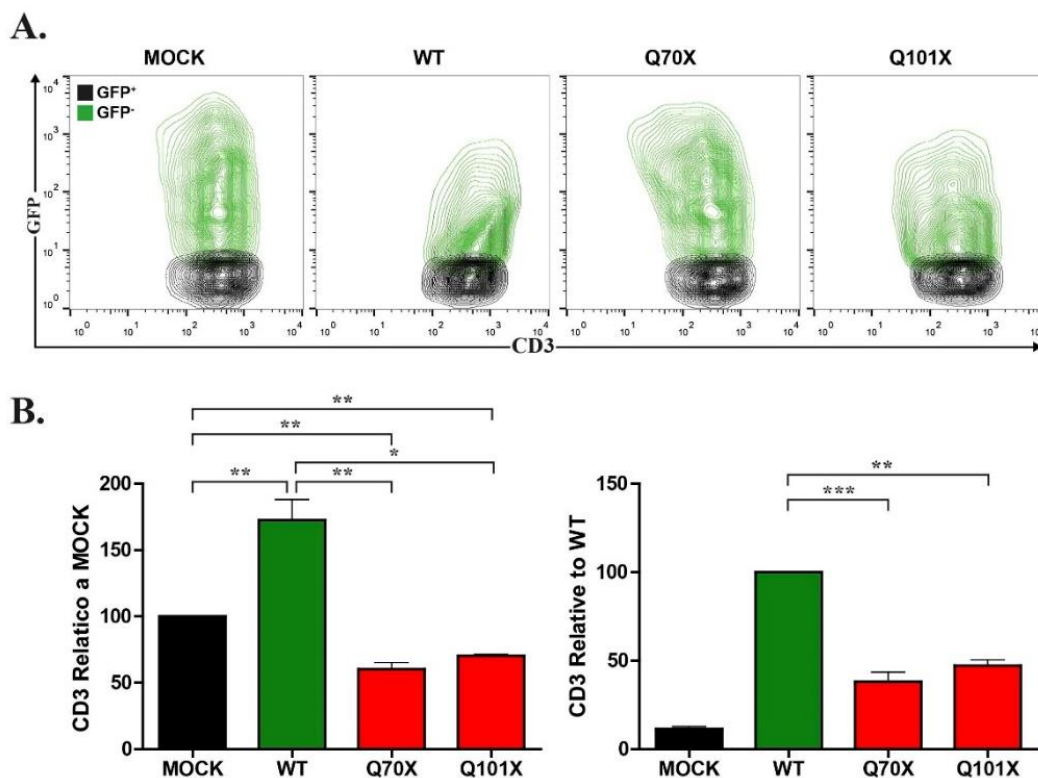
### 6.1.8.-Estudio del efecto de mutaciones *nonsense* en CD247 sobre la expresión superficial del TCR.

A la mutación del paciente Q70X, la cual consideramos como una posible mutación dominante negativa, se añadió un paciente pediátrico que presentaba



Linfopenia intermitente e infecciones recurrentes por (VHS) Un análisis exómico reveló la mutación p.Q101X en heterocigosis en el gen *CD247*, presente sólo en la isoforma 1, en el único residuo que las diferencia.

La transfección en líneas Jurkat control mostró, tanto con Q70X como con Q101X, una bajada de la expresión de CD3 extracelular, lo que confirma el rol de dominante negativo de esta nueva variedad. (**Figura 6.15 derecha,**) Estas dos variantes sin embargo al ser transfectadas en la línea ZKO sí que reconstituyeron (38 y 47%, respectivamente), los niveles de expresión de CD3, pero por debajo de WT y las reversiones somáticas. (**Figura 6.15 izquierda**).

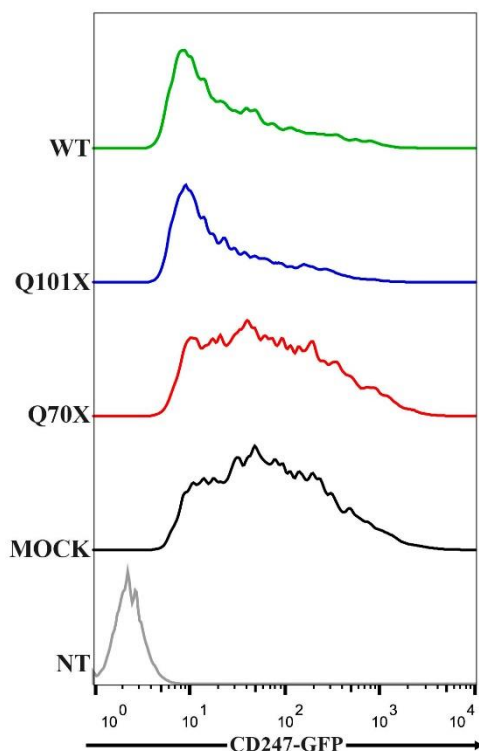


**Figura 6.15. Efecto de las mutaciones germinales en el TCR.** (A) Se transfectó la línea Jurkat control con los constructos CD247-GFP (WT, Q70X y Q101X). MOCK. Cuantificación de la expresión de CD3 en superficie relativo a la MOCK en líneas Jurkat control (izquierda) y en la línea ZKO relativo a la transfección de CD247 WT (Izquierda) (B). \*p-valor <0,05. \*\*p-valor <0,01. \*\*\*p-valor <0,001.

A pesar de que el efecto de ambas mutaciones sobre el TCR se observó similar, al observar el patrón de expresión de fluorescencia de los constructos



CD247-GFP, se ve que la variante Q101X tiene un patrón de expresión más bajo que Q70X muy semejante al de CD247WT (**Figura 6.16**).



**Figura 6.16. Patrón de fluorescencia de las variantes de CD247-GFP** Comparación mediante citometría de flujo del perfil de fluorescencia de los constructos CD247-GFP WT, Q70X, Q101X y MOCK transfectados en la línea ZKO.

## 6.2.-Estudio del defecto de BCL10 en la activación del linfocito T

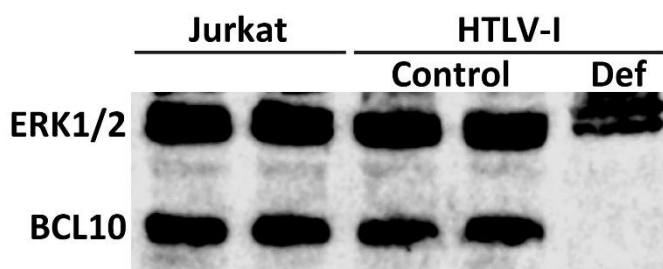
Con el objetivo de entender mejor el papel de BCL10 dentro de la biología de los linfocitos T y su implicación en el caso de la deficiencia de BCL10, estudiamos defectos funcionales de una línea celular derivada de un paciente BCL10 deficiente y por otro lado generamos por edición genómica generar 2 líneas Jurkat T, una deficiente, y otra heterocigota, donde poder estudiar el impacto de BCL10 en casos de baja expresión de la proteína.

### 6.2.1.-Análisis de la línea HTLV-I deficiente para BCL10

Mediante immortalización con HTLV-I se generó una línea linfoblástica proveniente de un paciente deficiente en BCL10 (Torres et al., 2014). Este paciente

presentaba una linfopenia T con ausencia de linfocitos de memoria. A nivel funcional, se vio un bloqueo de la proliferación por estimulación del TCR, y también de la inducción del correceptor ICOS por la misma vía.

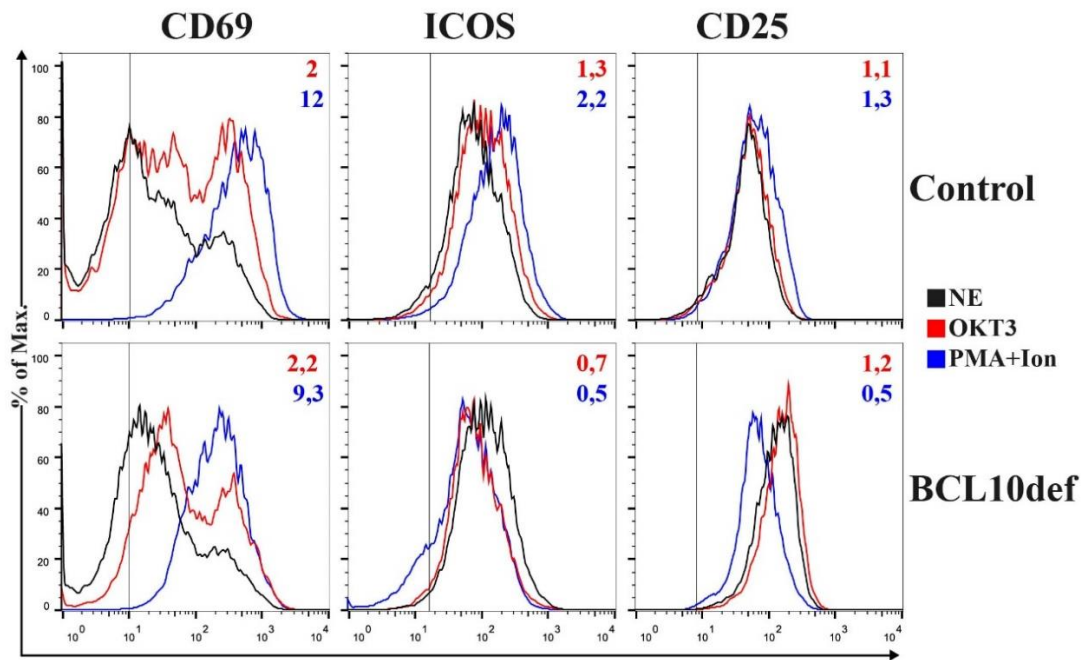
Una vez obtuvimos la línea inmortalizada (BCL10def) se continuó con la caracterización funcional del defecto ocasionado por la ausencia de BCL10. La línea presenta la mutación g.85741978C>T, que genera un *splicing* alternativo incapaz de sintetizar proteína, hecho que constatamos por *Western blot* (**Figura 6.17**).



**Figura 6.17.** La línea HTLV-I derivada del paciente no expresa BCL10. *Western blot* de lisados de las líneas Jurkat, HTLV-I control y deficiente para BCL10. Como control de carga se empleó ERK total (1 y 2).

Comprobamos que, tanto por estimulación anti-CD3 como por PMA + Ionomicina, la inducción de CD69 no variaba de la línea BCL10def respecto al control (**Figura 6.18**). La inducción de otros marcadores de activación como ICOS y CD25 sí se vio afectada, especialmente al estimular con PMA + Ionomicina, donde se vio que, en lugar de aumentar la expresión de estos marcadores, estos bajaban respecto a las células no estimuladas en la línea BCL10def (**Figura 6.18**).

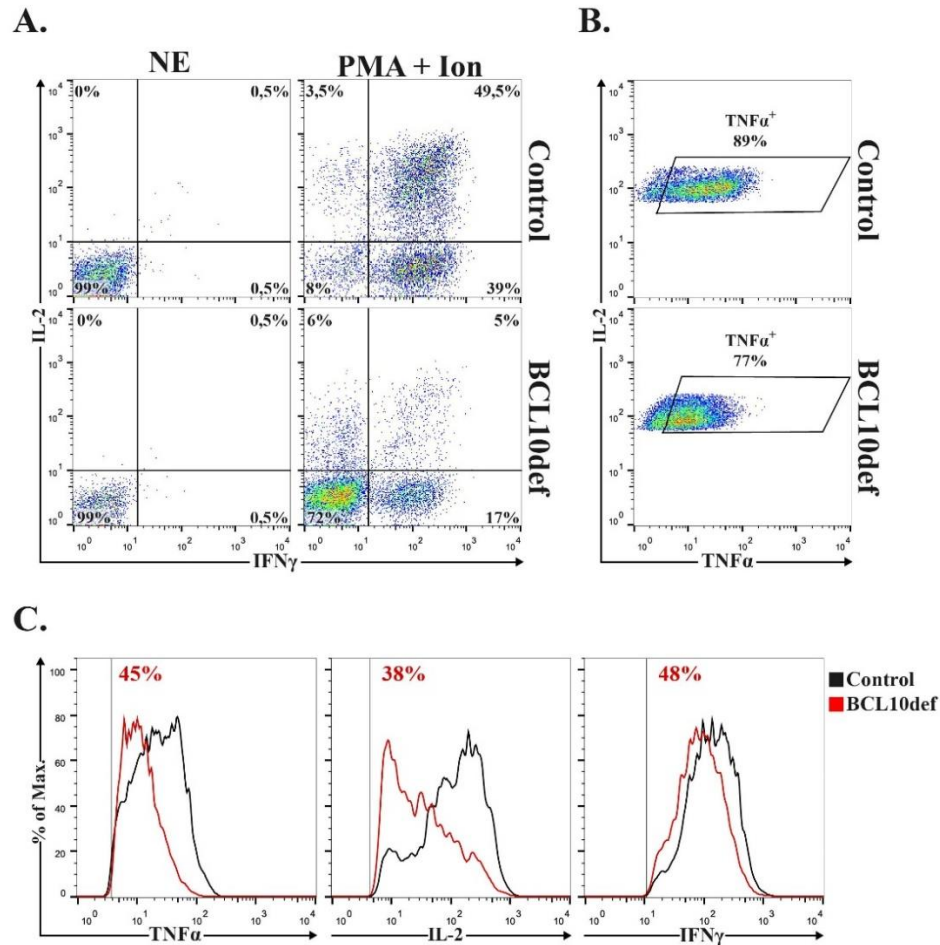
Medimos la producción de citoquinas pro-inflamatorias en la línea HTLV-I mediante tinción intracelular por citometría de flujo. La producción de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  estaba profundamente afectada respecto a la línea control (**Figura 6.19**).



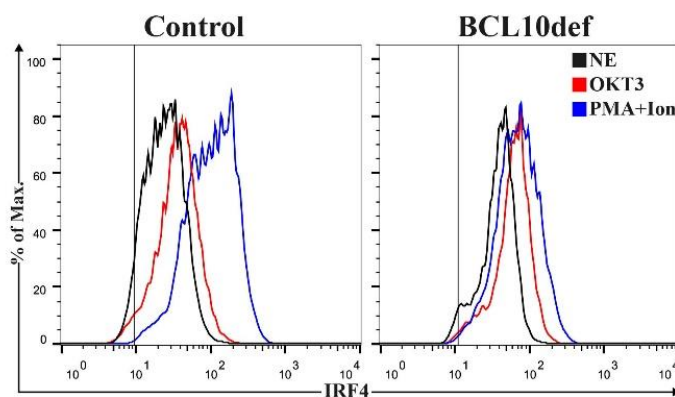
**Figura 6.18. Inducción de marcadores de activación.** Células HTLV-I control y BCL10def fueron incubadas durante 24 horas en presencia de diferentes estímulos y se evaluó la inducción de CD69, ICOS y CD25 por citometría de flujo. Arriba a la derecha del histograma aparece el ratio de la GeoMFI respecto a las mismas células sin estimular. NE= No estimulado; OKT3= anti-CD3 pegado a placa; PMA+Ion = PMA e ionomicina. La línea vertical representa el control de isotipo.

Viendo que la ruta de señalización acaba en la proteólisis de las proteínas de regulación post-transcripcional como Regnasa-1, que regulan el factor de transcripción IRF4, decidimos medir su inducción en estas células.

Las líneas HTLV-I expresan constitutivamente IRF4 al revés que los linfocitos primarios que solo lo expresan al activarse. IRF4 en la línea BCL10def se expresaba de forma normal sin diferencias respecto a la línea control, aunque su inducción con anti-CD3 y con PMA + Ionomycin sí se vio afectada respecto al control (**Figura 6.20**).



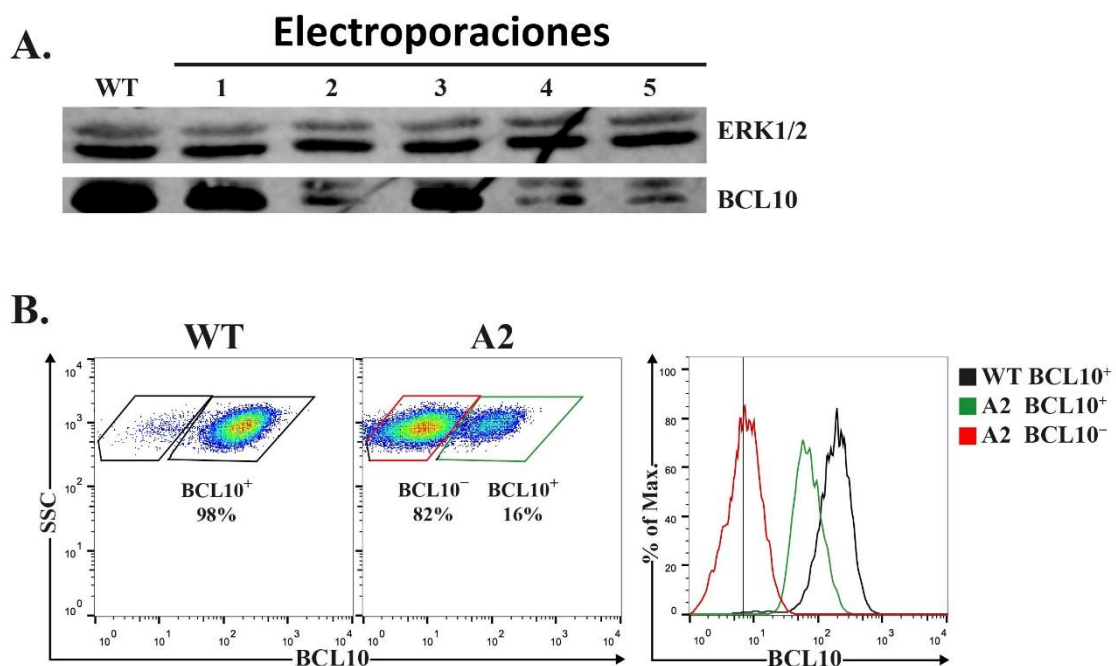
**Figura 6.19: Producción de citoquinas proinflamatorias.** Las células fueron incubadas durante 2 horas en presencia de PMA más ionomicina y posteriormente se añadió brefeldina A 6 horas más. En ese punto se fijaron y tiñeron intracelularmente para ser analizadas mediante citometría de flujo. Se analizó la proporción de células productoras de (A) IFN $\gamma$ , IL-2, (B) TNF $\alpha$  y (C) la expresión a nivel de fluorescencia de las células positivas para cada citoquina (C). La línea vertical representa el control de isotipo. NE= No estimulado. PMA+Ion = PMA e ionomicina.



**Figura 6.20. Inducción de IRF4.** Células HTLV-I control y BCL10def fueron incubadas durante 24 horas en presencia de diferentes estímulos y se analizó la inducción de IRF4 mediante tinción intracelular por citometría de flujo. NE= No estimulado; OKT3= anti-CD3 pegado a placa. PMA+Ion = PMA e ionomicina. La línea vertical representa el control de isotipo.

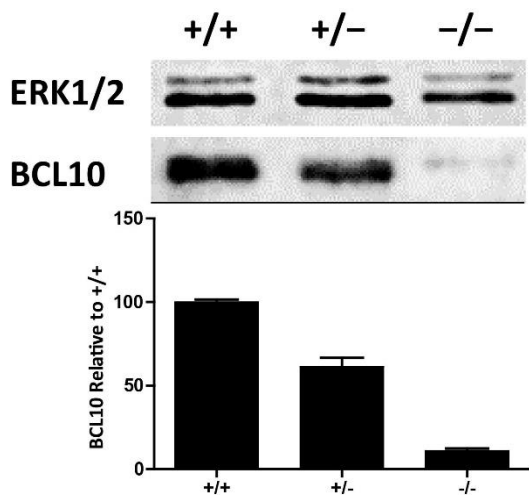
### 6.2.2.-Generación de líneas T Jurkat heterocigotas y deficientes en BCL10

Generamos líneas Jurkat J77 BCL10 deficientes ( $-/-$ ) y BCL10 heterocigotas ( $+/-$ ). Para ello, electroporamos la ribonucleoproteína Cas9 con las guías ARN específicas para el gen BCL10 que corte cerca del codón de inicio. Se realizaron dos electroporaciones, cada una de ellas por duplicado. A continuación, se dividió cada electroporación en 3 pocillos. Por *Western blot*, se seleccionó el cultivo donde la edición de BCL10 presentó más eficiencia, en este caso el cultivo 2, y se hizo una dilución límite para obtener poblaciones monoclonales (**Figura 6.21 A**). En el clon A2 encontramos por citometría la presencia de dos poblaciones diferentes: una mayoritaria que no expresaba BCL10 y otra que sí lo hacía, pero con un nivel intermedio respecto a la línea control ( $+/+$ ) (**Figura 6.21 B**).



**Figura 6.21. Edición genética de BCL10.** Las células Jurkat fueron electroporadas y cultivadas por separado en diferentes placas. (A) Una semana después de la electroporación se obtuvieron lisados celulares y se analizó por *Western blot* la edición de BCL10. (B) A la izquierda, análisis por citometría de flujo de la colonia A2 procedente de la dilución límite del cultivo 2, que presentaba menor expresión de BCL10. A la derecha, histogramas con la MFI de dichas tinciones. La línea vertical representa el control de isotipo.

Tras una segunda dilución límite, se consiguió purificar la población deficiente ( $-/-$ ) y la población con niveles intermedios y se comprobó, como ya se había observado por citometría, que los niveles de BCL10 se expresaban cercanos al 50%, por lo que consideramos a esta línea haploinsuficiente ( $+/-$ ) (**Figura 6.22**). La línea  $+/-$  fue secuenciada para verificar la expresión de BCL10 que observamos es de la molécula sin cambios. Mediante PCR con cebadores específicos para secuenciar la región de la diana CRISPR, se observaron en la línea  $+/-$  dos bandas. Estas, bandas al ser secuenciadas por separado, mostraron que la banda del tamaño correcto presentaba la secuencia WT (El alelo A que no había sido editado), mientras que el alelo B tenía la delección larga g.1816del132 que rompía el marco de lectura y el sitio de *splicing*, rompiendo desde el residuo 9 la proteína (p.9fsX29) (**Figura 6.23**).

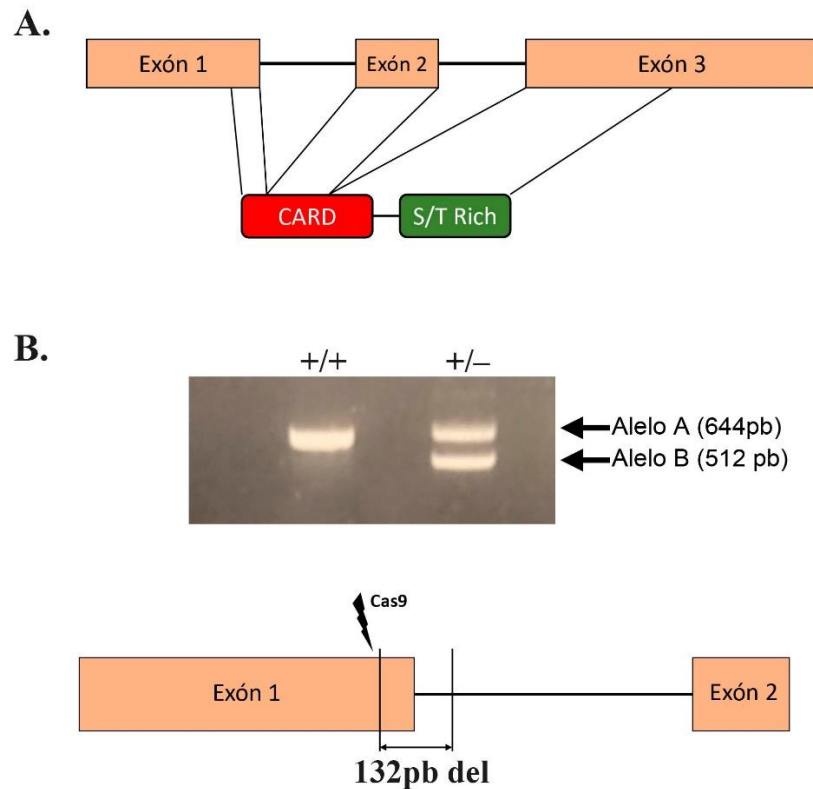


**Figura 6.22. Expresión de BCL10 en las líneas  $+/+$  y  $+/-$ .** Arriba, *Western blot* de lisados de las líneas Jurkat  $+/+$ ,  $+/-$  y  $-/-$ , para BCL10. Como control de carga se empleó ERK total (1 y 2). Abajo, cuantificación de la expresión de la banda correspondiente a BCL10 relativizado a la línea  $+/+$ .

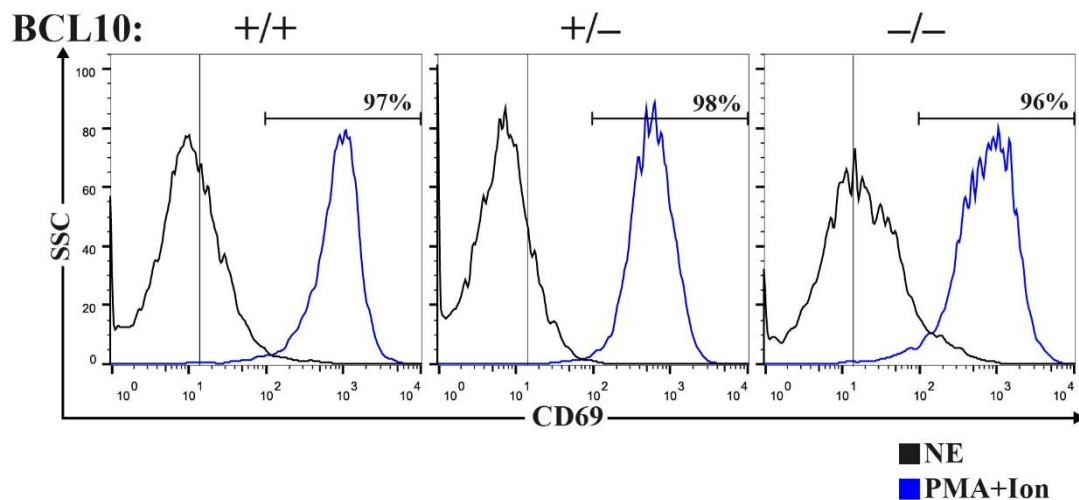
### 6.2.3.-Comparación de la afectación de la respuesta T a distintos niveles de expresión de BCL10

Las estimulaciones en estas líneas se hicieron con PMA + Ionomicina, que es el estímulo más adecuado para estudiar esta ruta ya que la PMA activa a PKC, iniciador del complejo CBM.

La inducción de CD69 en las líneas haploinsuficiente ( $+/-$ ) y deficiente ( $-/-$ ) para BCL10 respecto a las líneas control ( $+/+$ ) no se vio afectada (**Figura 6.24**).



**Figura 6.23. Edición genética de la línea Jurkat BCL10 +/+.** Esquema del gel y la proteína de BCL10. Electroforesis de agarosa de productos amplificados por PCR con cebadores que flanquean la región de la diana empleada para la edición genética. Representación de la mutación del alelo 2 de la línea +/-.



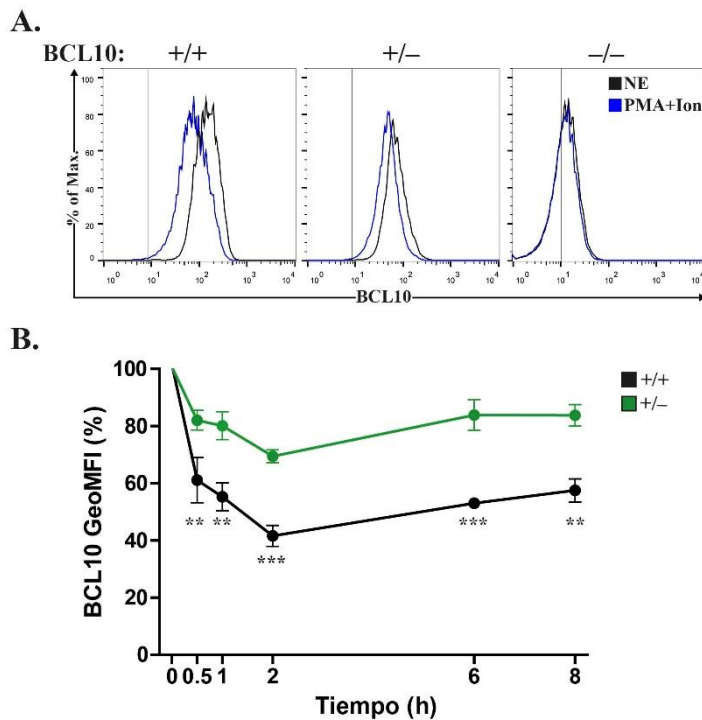
**Figura 6.24. Inducción de CD69.** Las líneas Jurkat control, haploinsuficientes y deficientes para BCL10 fueron incubadas durante 18 horas en presencia de PMA+ ionomicina (Histograma azul) o sin ningún estímulo (negro) y se evaluó la inducción de CD69 por citometría de flujo. La línea vertical representa el control de isotipo.

La actividad proteolítica de MALT1 dentro del complejo se evaluó mediante el análisis de *down-modulation* del complejo CBM, llevado a cabo mediante la proteólisis por parte de MALT1 de sí misma y de BCL10 para regular la intensidad y duración de la señal que transduce. Con la activación de las células +/+ con PMA + Ionomicina, se observa como éstas alcanzan, a las dos horas, el pico máximo de reducción de BCL10, que baja un 60% respecto a antes de ser estimuladas, y a partir ese punto su expresión se estabiliza. En la línea +/- esta tendencia se mantiene igual, pero con una reducción más tenue y significativa en todos los puntos de tiempo analizados, por lo que la actividad proteolítica, aunque funcional, está afectada en un modo de haploinsuficiencia (**Figura 6.25**). También analizamos la proteólisis de la proteína antiinflamatoria Regnasa-1, una ribonucleasa que degrada RNAs proinflamatorios, que es sustrato de MALT1. La reducción de Reg-1 a 8 horas en la línea +/+ mantenía bajos los niveles de expresión de Reg-1, mientras que las líneas +/- y -/- sobreexpresaban Reg-1 de la misma manera sin encontrar diferencias significativas entre ellas (**Figura 6.26**).

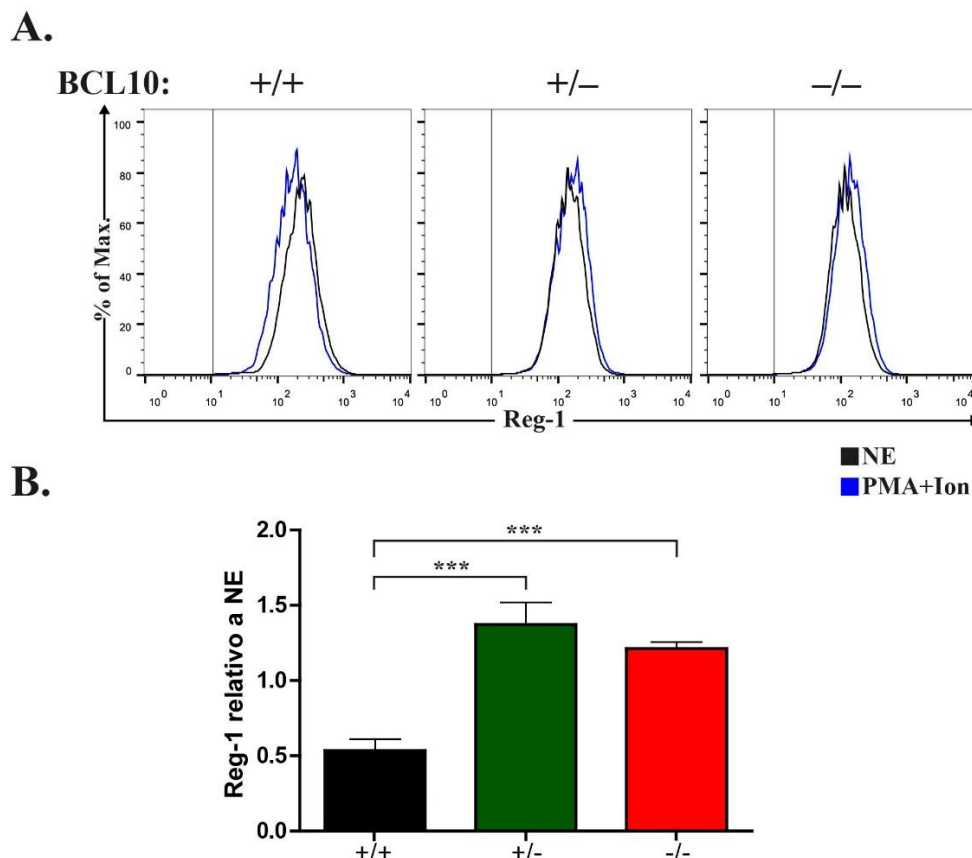
La inducción de CD25, al estimular con PMA + ionomicina, se vio reducida a la mitad en las líneas +/- y en la línea -/- por igual (Control 18% vs +/-11% y -/- 10% (**Figura 6.27**).

Finalmente, al analizar la producción de IL-2, encontramos que estaba bloqueada en la línea -/-, como ya habíamos observado en las líneas HTLV-I deficiente para BCL10. En la línea +/- la proporción de células productoras descendió del 14% del control al 2,7%. Si miramos la expresión intracelular de IL-2 vemos que la línea +/- expresan en torno a la mitad de IL-2 respecto a la línea control (**Figura 6.28**), viéndose la vía NF- $\kappa$ B, más afectada que la proteolítica.

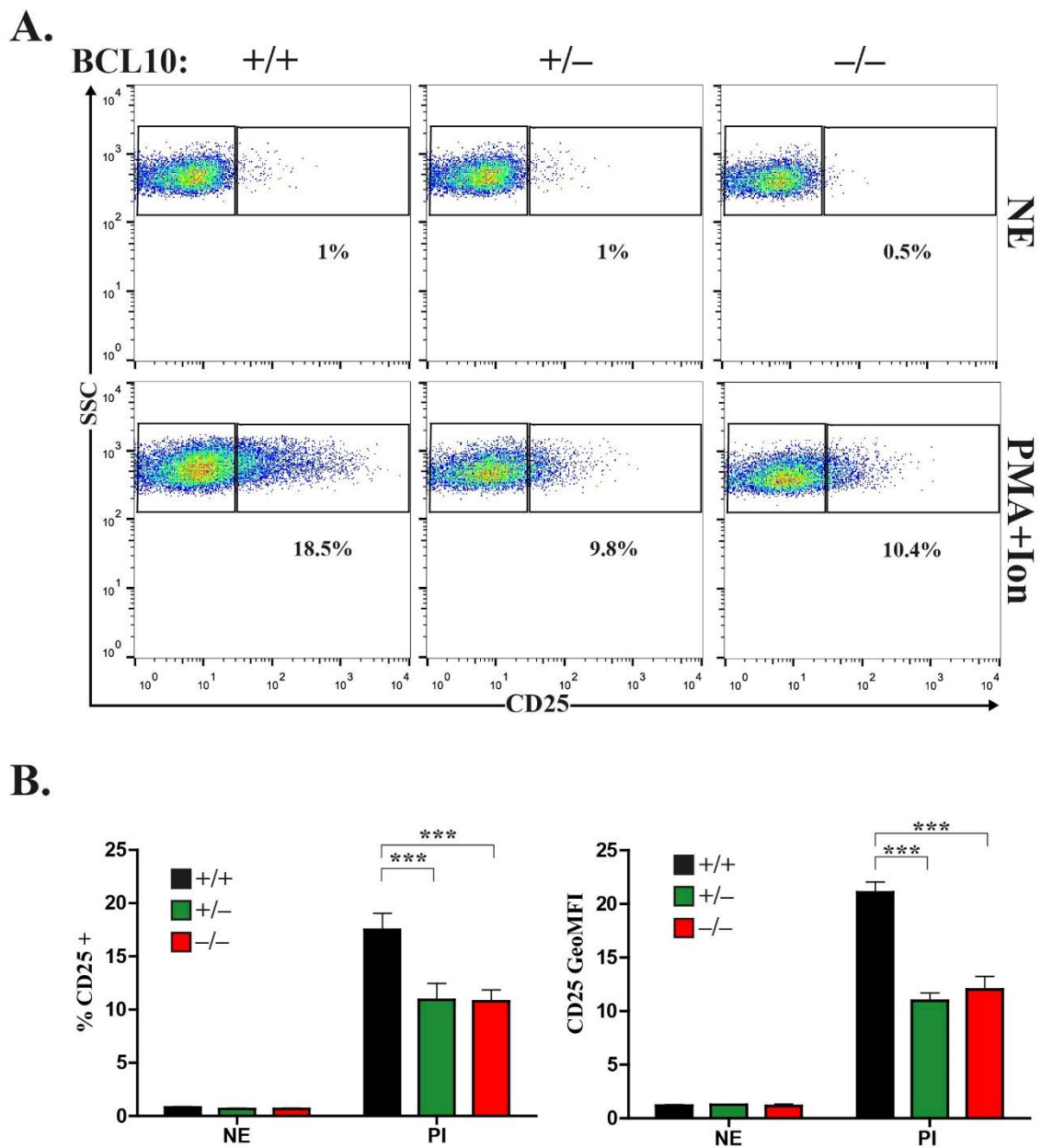




**Figura 6.25. Modulación de BCL10.** (A) Células +/+, +/- y -/- fueron incubadas a diferentes tiempos en presencia de PMA + ionomicina y se analizó, por citometría de flujo, la reducción de expresión de BCL10. Histogramas con tinciones de BCL10 a 2 horas de estimulación. La línea vertical representa el control de isotipo. (B). Dinámica de la expresión de BCL10 a distintos tiempos en las líneas +/+ y +/- normalizado respecto a las células sin estimular. NE= No estimulado; PMA+Ion = PMA e ionomicina. \*\*p-valor <0,01. \*\*\*p-valor <0,001.

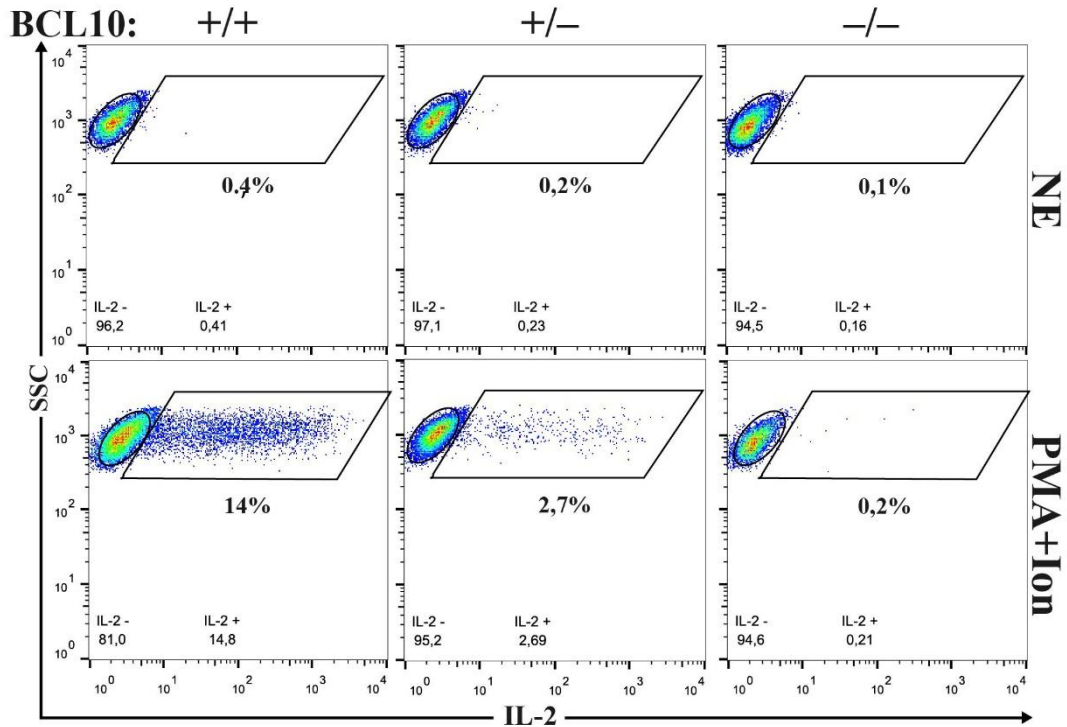


**Figura 6.26. Modulación de Regnasa-I.** Células +/+, +/- y -/- fueron incubadas 8 horas en presencia de PMA e ionomicina y se analizó, por citometría de flujo, la reducción de expresión de Reg-1. (A) Histogramas con tinciones de Reg-I a 8 horas de estimulación. (B) Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de Reg-1 normalizada a la condición sin estimular. NE= No estimulado. PMA+Ion = PMA e ionomicina. \*\*\*p-valor <0,001.

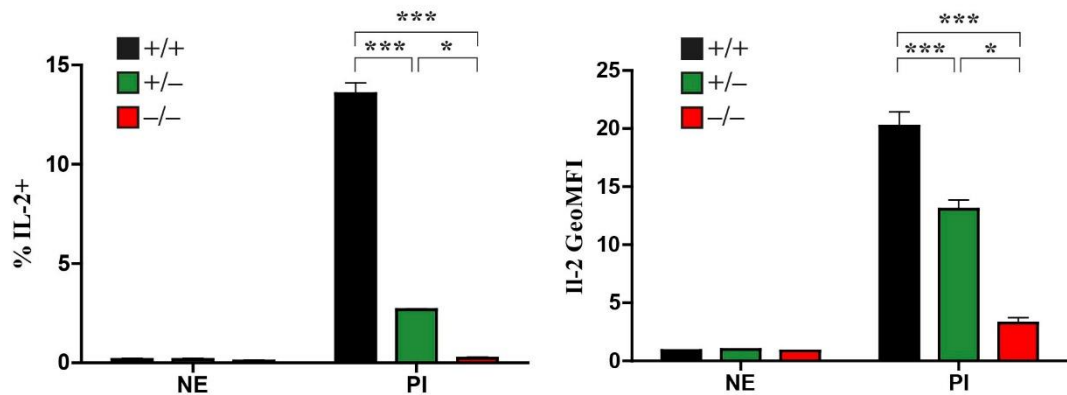


**Figura 6.27. Inducción de CD25.** Las células fueron incubadas durante 48 horas en presencia de PMA + ionomicina se tiñeron intracelularmente para ser analizadas mediante citometría de flujo (A) Se analizó la proporción de células CD25<sup>+</sup> (Izquierda) y la intensidad de fluorescencia para dicho marcador de las células CD25<sup>+</sup> (derecha). NE= No estimulado. PMA+Ion = PMA e ionomicina. \*\*\*p-valor <0,001.

**A.**



**B.**



**Figura 6.28. Evaluación de la producción de IL-2 pro-inflamatoria.** (A) Las células fueron incubadas durante 2 horas en presencia de PMA + ionomicina y posteriormente se añadió brefeldina A 6 horas más. En ese punto se fijaron y tiñeron intracelularmente para ser analizadas mediante citometría de flujo. Análisis de la proporción de células productoras de IL-2 (izquierda), y de la intensidad de fluorescencia de las células IL-2<sup>+</sup> para IL-2 (derecha). NE= No estimulado. PMA+Ion = PMA e ionomicina. \*p-valor <0,05; \*\*\*p-valor <0,001.

---

## **7.-Discusión**

---

-

## **7.1.-Modelos celulares CD247 y el TCR**

### **7.1.1.-Nuevos modelos celulares para el estudio del rol de CD247 en humanos**

En este trabajo hemos buscado la generación de líneas T deficientes para *CD247* como modelos para el estudio de este gen en linfocitos T. Históricamente, fuera de los modelos animales, la única forma de hacer análisis de la biología de *CD247* en el TCR era con la línea de ratón MA5.8. Esta línea reconstituye muy eficientemente los niveles del TCR en superficie con *CD247* de distintas especies como humano (Roberts et al., 2007), ratón (Dietrich et al., 1999) y pollo (Gobel and Bolliger, 1998), pero al ser una línea de ratón la biología del TCR no es exactamente igual (Marin et al., 2014), lo que podría llevar a errores. En contraposición a nuestros datos, en lo que respecta a la región intracelular del TCR, se ha visto que al reconstituir el TCR con un constructo de *CD247* en el cual se deleta la mayor parte de la región intracelular, la línea MA5.8 reconstituye de manera completa el TCR (Hermans and Malissen, 1993).

El paciente deficiente de *CD247* con la mutación Q70X (Rieux-Laucat et al., 2006) presentaba un defecto severo de expresión de TCR en superficie, lo que se traduce en que la región citoplasmática en humano es determinante para el correcto transporte del TCR. En nuestros datos, al transfectar y transducir en la línea PM1T humana el *CD247* Q70X no se observa reconstitución del TCR, y se ve una subida de la expresión de *CD3* muy baja en la línea Jurkat ZKO, pareciéndose más a lo observado en este paciente, lo que apoya que sean un mejor modelo respecto a las MA5.8.

La reconstitución mediante transfección en línea PM1T, aunque informativa, era bastante baja, por lo que cambiamos de estrategia y usamos transducción retroviral para la reconstitución (Martinez-Barricarte et al., 2016). Utilizando un retrovirus conseguimos una reconstitución mucho más eficiente, pero el proceso de transducción de células HTLV-I, que han sido generadas por

inmortalización de un retrovirus, hace que la infección sea muy complicada y el porcentaje de células transducida fuera muy bajo.

Ante las dificultades de trabajo de la línea HTLV-I consideramos que, aunque la información que nos ha dado la línea PM1T es relevante, su uso como modelo no sería el más idóneo. Por ese motivo decidimos generar una nueva línea T deficiente de CD247 partiendo de líneas Jurkat, una línea celular ampliamente usada en el estudio de células T y fácil de cultivar y transfectar. Mediante el sistema de edición genómica CRISPR/Cas9 la edición de *CD247* dio lugar a la línea ZKO. Esta línea se asemeja fenotípicamente a las líneas ya descritas MA5.8 y a PM1T, así como de los pacientes descritos.

Una ausencia de CD247 intracelular supone una reducción drástica de CD3ε en superficie y una reducción significativa a nivel intracelular. Esta reducción también se refleja en los linfocitos T en la deficiencia humana de CD247 (Marin et al., 2017). La explicación a este fenómeno podría ser que, al no incorporar CD247, el complejo TCR hexamérico (TCRαβ-CD3γε-CD3δε) no puede ser transportado a superficie, y se queda retenido en el aparato de Golgi, donde se envía finalmente hacia el lisosoma para ser degradado (Sussman et al., 1988).

Mediante la estimulación vía TCR con anti-CD3, la inducción de CD69 fue menos aguda que en HTLV-I, pero cuantificable. Este problema en futuros estudios se podría solventar utilizando conjugados con células presentadoras RAJI con superantígeno SEE, que genera una respuesta muy intensa en las líneas Jurkat J77 (Castro-Sanchez et al., 2018).

El virus HTLV-I que inmortalizó a las células PM1T, transdujo la proteína Tax a las células que empleamos, que genera un estado crónico de activación de rutas, entre otras IKK, activando NF-κB (Curren et al., 2012). Para futuros estudios funcionales referentes a reconstitución de CD247, sería más recomendable el uso de la línea ZKO.

La reconstitución de CD247 mediante transfección en las células ZKO fue muy efectiva. Al transfectar CD247 WT en la línea ZKO los niveles de expresión

de CD3 en superficie se distanciaron mucho de los de las células no transfectadas, siendo la cantidad de CD247-GFP directamente proporcional a la expresión de TCR.

La reconstitución del TCR en estas líneas es funcional, lo que permite hacer ensayos sobre distintas mutaciones o alteraciones de CD247 y su impacto en la señalización, como se podía hacer con las células MA5.8 (Gobel and Bolliger, 1998; Sussman et al., 1988).

### **7.1.2.-Disparidad en la reconstitución de las reversiones somáticas**

Las mutaciones somáticas, tanto en PM1T como en MA5.8, se comportaron de la misma manera. Las mutaciones Q70L y Q70W reconstituyeron a los mismos niveles que CD247 WT, pero Q70Y lo hizo a niveles mucho más bajos. Los análisis que realizamos por *Western blot* y por análisis del patrón de intensidad de GFP, mostraron que esa variación se expresa mucho menos que las otras dos. La explicación podría ser que esta variación desestabiliza CD247 y este se degrada más rápido. El hecho de que Q70Y reconstituya significativamente peor que las otras dos reversiones somáticas, contrasta con el hecho de que al describir la población revertiente esta era homogénea en cuanto a la expresión de CD3, es decir, no había distintas poblaciones con distintos niveles de CD3.

A nivel funcional, las reversiones somáticas del paciente con mutación en Q70X (10% de linfocitos CD3) no eran funcionales (Rieux-Laucat et al., 2006), mientras que las células revertientes del otro paciente estudiado sí que lo eran, siendo menos del 0,5% de linfocitos T totales (Marin et al., 2017). Este hecho hace pensar que el proceso de reversiones somáticas no es tan sencillo de explicar cómo una ventaja selectiva y que, en algunos genes como *CD247*, estas mutaciones ocurren con más frecuencia y por procesos que aún no entendemos. Se ha observado previamente que la reversión somática p.M1Text-3 en MA5.8 reconstituye la expresión del TCR, pero peor que CD247 WT (Blazquez-Moreno et al., 2017). En ese mismo trabajo se estudian el número de polimorfismos en



distintos genes inmunitarios, y constatan que los genes en los que se han observado reversiones somáticas tienen mayor número de polimorfismos descritos en la región codificante que los que no.

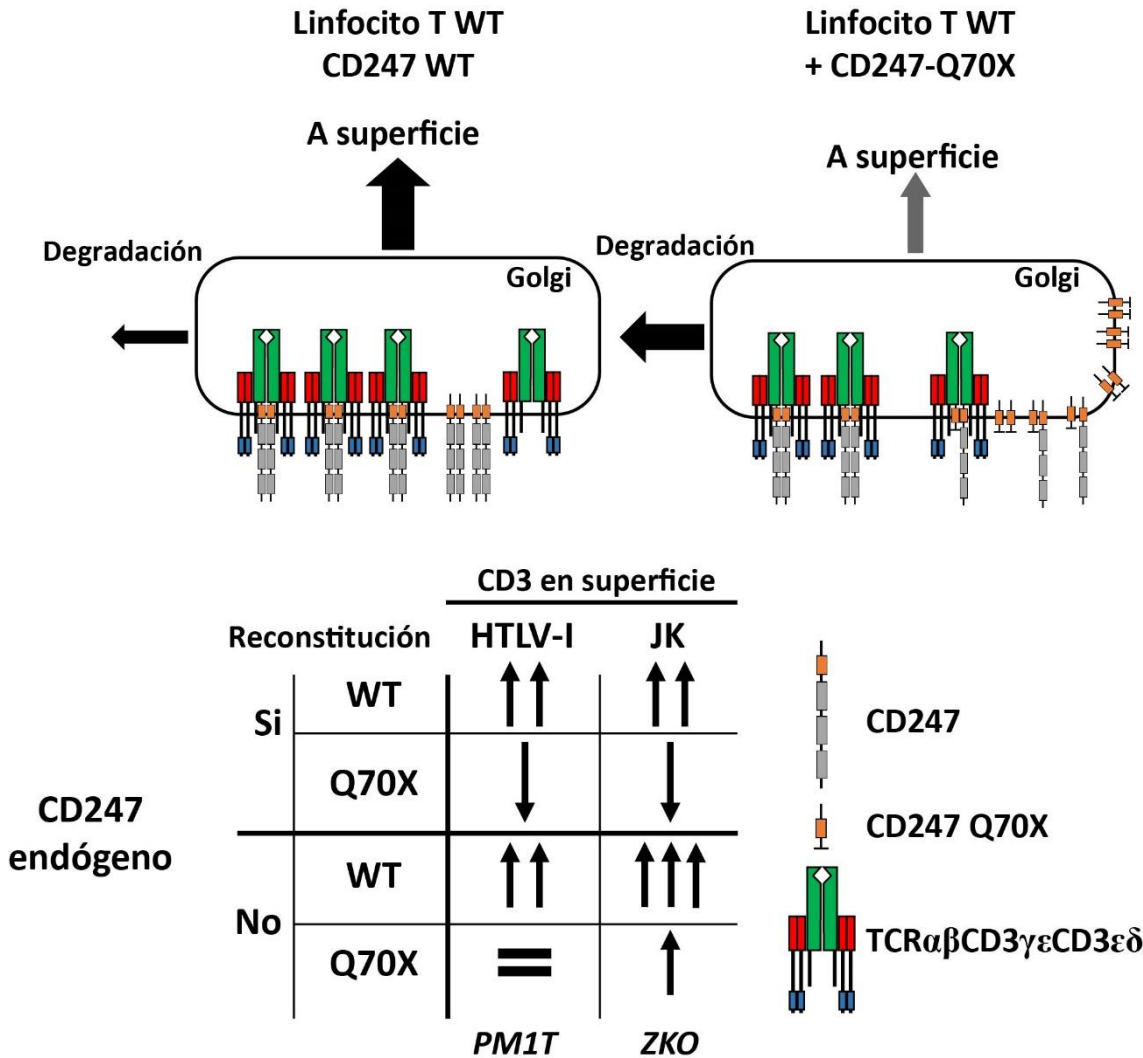
### **7.1.3.-Las mutaciones en CD247 Q70X y Q101X tienen un efecto dominante negativo sobre el TCR.**

Al transfectar CD247 WT en líneas Jurkat control, la expresión de CD3 aumenta, lo que apoya el modelo que estipula que, en el proceso de ensamblaje del TCR, CD247 es la etapa limitante (Dietrich et al., 1999). Al sobreexpresar CD247 en estas células, el resto de TCR hexamérico se puede ensamblar y transportarse a la superficie celular. La mutación Q70X, sin embargo, consigue el efecto contrario. Tanto en líneas HTLV-I por retrovirus como en la línea ZKO vemos como los niveles de TCR en superficie bajan.

El hecho de que la proteína CD247-Q70X altere los niveles de expresión del TCR, nos hace pensar que este fragmento de CD247 de 70 aminoácidos, en el que no se expresa ningún motivo ITAM ni región intracelular, interacciona con la molécula CD247 WT endógena, posiblemente formando heterodímeros. Estos heterodímeros retirarían el CD247 endógeno disponible para formar TCRs completos, reduciendo la expresión de CD3 en superficie. Estos datos coincidirían con lo observado en sujetos portadores en heterocigosis la mutación p.M1T (Marin et al., 2017) que expresaban la mitad de CD247 y la mitad de CD3 de superficie respecto a sujetos control.

La transfección de la variante Q70X en la línea PM1T no reconstituía. En contraste, en la línea ZKO los niveles de CD3 sí aumentaban ligeramente, muy por debajo de lo que lo hacía la línea MA5.8 de ratón. Eso indica que en caso de total ausencia de CD247 WT el TCR podría llegar a incorporar el dímero WT-Q70X o Q70X-Q70X, aunque mucho peor que CD247WT.

Atendiendo a este modelo, mutaciones de codón de parada prematura en CD247, que mantuviesen la región citoplasmática con la que interaccionar con el TCR, se podrían comportar como dominantes negativos. (**Figura 7.1**)

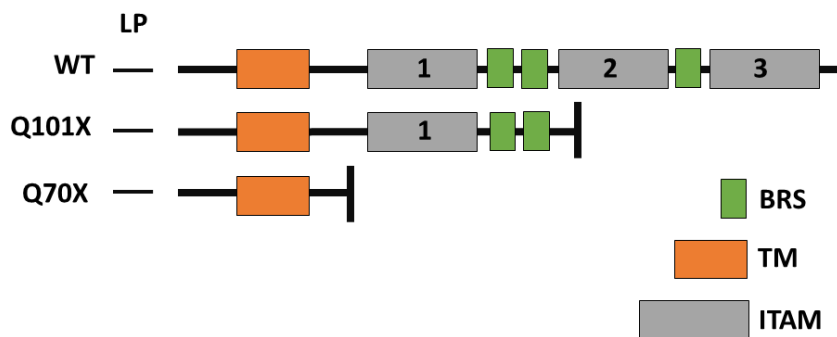


**Figura 7.1.** Efecto dominante negativo de Q70X sobre la expresión del TCR. Arriba: esquema de la fase final del ensamblaje y transporte del TCR en Golgi, en condiciones normales y en presencia de la variante Q70X. Abajo: esquema donde se recopilan los resultados sobre el efecto de la reconstitución, en líneas T normales y deficientes para CD247, sobre la expresión del TCR en superficie.

Este modelo nos sirvió para evaluar un nuevo caso de un paciente con un defecto parcial en CD247 (no publicado). Este paciente presentaba clínica de infecciones recurrentes, y un análisis exómico aportó como posible causante una mutación en CD247, en concreto en la glicina 101 de la isoforma 1. Para demostrar

que esta mutación podía ser la causante del efecto, clonamos la mutación y la transfectamos en nuestro modelo, demostrando que se comportaba de la misma manera que Q70X, y por lo tanto como un dominante negativo.

En los 31 aminoácidos de diferencia entre la mutación Q70X y Q101X se encuentra el primer ITAM y dos secuencias ricas en aminoácidos básicos (BRS). CD247 contiene 3 BRSs (**Figura 7.2**), las cuales se ha comprobado que son necesarias para la unión de las colas citoplasmáticas a la membrana (Zhang et al., 2011).



**Figura 7.2.** Esquema de la molécula CD247 y del impacto de las dos mutaciones germinales estudiadas

Esta mutación se encuentra únicamente en la isoforma 1 de CD247, que solo se diferencia en la incorporación de la glicina 101 en la que reside la mutación. La isoforma 1 en linfocitos T es minoritaria (Atkinson et al., 2003), y nuestros datos muestran que reconstituye significativamente peor el TCR que la isoforma 2 canónica. Esto podría indicar que su función en el linfocito T es la de modular la expresión del TCR. Parecería improbable que una mutación en heterocigosis que solo afecta a la isoforma minoritaria pudiese suponer un defecto suficiente para causar un impacto clínico, pero debemos tener en cuenta que una mutación en una posición de *splicing* podría afectar también a la isoforma 2, que no se ha estudiado.

El patrón de expresión que observamos por la intensidad de fluorescencia de GFP por citometría mostró que, aunque ambas mutaciones producen un efecto

de reducción de CD3 similar, Q70X y Q101X tienen un patrón de expresión muy diferente. Q101X se comporta de manera similar a la cadena WT, mientras que Q70X se expresa de manera mucho más intensa, más parecido a transfectar GFP sin fusionar. Estos datos parecen indicar que los dominios BRS y el punto de unión a membrana son importantes para la propia expresión de CD247, pero no para su papel sobre el del TCR.

## **7.2.-Papel de BCL10 en la función de los linfocitos T**

### **7.2.1.-Impacto de la deficiencia de BCL10 en la biología del linfocito T**

El uso de líneas T derivadas del único paciente deficiente de BCL10 descrito, así como de otra línea generada por edición genética, nos han permitido ampliar lo que sabemos sobre el impacto de la ausencia de BCL10 en los linfocitos T humanos con respecto a lo que se publicó en su momento el paciente en cuestión (Torres et al., 2014).

La inducción de CD69 en las células deficientes para BCL10, tanto HTLV-I como en la línea Jurkat  $-/-$ , no se vio afectada, por lo que es un mecanismo independiente del CBM. Este hecho concuerda con lo observado en células primarias del paciente deficiente para BCL10 (Torres et al., 2014). Además, está caracterizado que CD69 se regula a través de la vía de señalización de ERK (Altan-Bonnet and Germain, 2005).

ICOS y CD25 se modulaban negativamente al estimular las células BCL10def. En este tipo de línea, la activación constitutiva por efecto del virus HTLV-I hace que estos marcadores se expresen en condiciones basales, pero la estimulación de estas células puede inducir sobreexpresión de estos en condiciones normales (ninguna deficiencia genética). CD25 e ICOS son inducidos por el factor de transcripción NFAT (Hermann-Kleiter and Baier, 2010; Tan et al., 2006), que se activa por la vía  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina, un proceso independiente de BCL10. Sin

embargo, en el paciente del que derivan la línea BCL10def (Torres et al., 2014) la inducción de ICOS y CD25 en linfocitos T estaba afectada.

En cuanto a la producción de citoquinas, el defecto de producción en linfocitos T de las citoquinas IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  no se puede comparar con el paciente ya que no se analizó, pero la reducción en la producción de IL-2 sí coincide con el fenotipo del ratón BCL10 KO (Ruland et al., 2001). IL-2 es un gen muy estudiado, y su regulación depende de varios factores de transcripción distintos, entre ellos juega un papel crucial NF- $\kappa$ B, parte final en la cascada de señalización del CBM (Ruland and Hartjes, 2019).

Si comparamos todos los datos de marcadores de activación y producción de citoquinas analizados en la línea BCL10def con lo reportado en las inmunodeficiencias de CARD11 y MALT, podemos encontrar muchas similitudes. Se ha observado como la inducción de CD69 no se ve afectada en la deficiencia de CARD11 (Frizinsky et al., 2019). El defecto de inducción de IL-2 es el mejor estudiado y el que más se repite, tanto en CARD11 como en MALT1 (Frizinsky et al., 2019; McKinnon et al., 2014; Punwani et al., 2015). ICOS solo ha sido analizado en la deficiencia de CARD11 (Stepensky et al., 2013), mostrando también un defecto en su expresión tras ser activado. La inducción de CD25 se encuentra reducida pero no ausente en los tres genes del CBM (Frizinsky et al., 2019; Stepensky et al., 2013; Torres et al., 2014).

La degradación de Regnasa 1 por el CBM se vio afectada en la línea Jurkat deficiente para BCL10 (–/–). En líneas T la activación por PMA + Ionomicina reduce la expresión de Reg-1, mientras que las células BCL10 deficientes sobreexpresan esta proteína respecto a su forma basal. Estudios realizados también con células Jurkat deficientes para BCL10 muestran que al ser estimuladas a tiempos cortos Reg-1 no se degrada (Schlauderer et al., 2018), lo que no es incompatible con nuestros datos, que indican que a tiempos más largos Reg-1 se sigue manteniendo baja en líneas control mientras que se sobreexpresa en las líneas deficientes. Una forma de explicar la sobreexpresión a tiempos largos de Reg-1 en

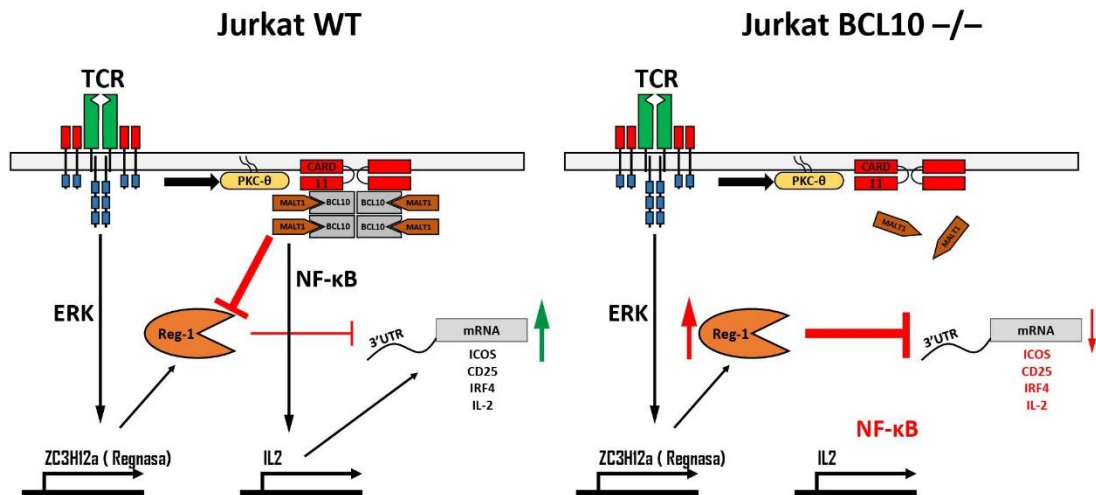
las líneas deficientes es que Reg-1 es inducible por ERK (Kasza et al., 2010), por lo que a tiempos más largos en los que no hay control negativo por parte del CBM, esta molécula aumenta su expresión.

De los marcadores que hemos estudiado muchos están regulados a su vez por Regnasa 1 y 2 ICOS, CD25, IL-2, IRF4 (Mao et al., 2017) e IFN $\gamma$  (Cui et al., 2017), lo que daría un doble control de regulación del CBM sobre estas respuestas del linfocito T.

En ausencia de BCL10, IRF4 obtiene su inducción por PMA + Ionomicina. IRF4 es un factor de transcripción de la familia de los factores reguladores de interferón, y su papel es imprescindible para la diferenciación de macrófagos anti inflamatorios M2 (Juhas et al., 2015) y los linfocitos cooperadores Th17 (Ciofani et al., 2012). Las líneas HTLV-I expresan IRF4 de manera constitutiva debido a esa activación crónica que genera el retrovirus mientras que las líneas Jurkat no expresan IRF4 (Suzuki et al., 2010), por lo que no pudo analizarse en esa línea.

La relación entre el CBM y de IRF4 está establecida a través de Regnasa 1 (Jeltsch et al., 2014), donde la degradación por proteólisis de esta proteína que ejerce la paracaspasa MALT1 es necesaria para la diferenciación de linfocitos Th17 y la correcta expresión de IRF4. Extrapolando esto a nuestros datos, la deficiencia de BCL10 impediría la formación del CBM y, en consecuencia, la inducción de IRF4 se vería frenada.

Agrupando nuestros resultados podemos discernir que, si la ruta del CBM, que reduce los niveles de Regnasa 1, está afectada, pero la vía de señalización de ERK, por la que se induce, funciona con normalidad, es lógico esperar que los niveles de Regnasa 1 se incrementasen en lugar de reducirse, así como ejercer un control post-transcripcional más estricto y ver una reducción en la expresión de estos marcadores de activación (**Figura 7.3**)



**Figura 7.3. Defecto de BCL10 en linfocitos T.** Si en linfocitos T se expresa BCL10 con normalidad, el CBM cumple su señalización hacia inducción de genes proinflamatorios, como IL-2, y proteoliza Regnasa-1 (Reg-1) para que genes de la ruta de NF- $\kappa$ B u otros genes que también sean diana sean degradados (ICOS, CD25, IRF4). En la deficiencia de BCL10 la degradación de Reg-1 no ocurra, pero si su inducción por la vía ERK, lo que hace que se sobreexprese y reprima con más intensidad a estos factores proinflamatorios

### 7.2.2.-La reducción de los niveles de BCL10 por heterocigosis se comporta como una deficiencia completa

El uso de CRISPR/Cas9 nos ha permitido generar, además de la línea Jurkat deficiente, una línea heterocigota con niveles intermedios de proteína.

Analizamos el proceso de auto modulación del CBM, ya que MALT1 tiene como diana de proteólisis a BCL10 (Rebeaud et al., 2008) y a sí mismo (Baens et al., 2014). Pudimos ver como a distintos tiempos la cantidad de BCL10 bajaba en la línea Jurkat +/+, mientras que en la línea +/- esta bajada fue significativamente menor.

La degradación de Reg-1 en las células +/- también fue anómala, y sobreexpresó al mismo nivel que la línea deficiente -/-, lo que indica que la actividad proteasa del complejo no estaba funcionando.

La inducción de CD25 estaba reducida a la mitad tanto en la línea deficiente como en la heterocigota, lo que indica que el proceso por el que BCL10 regula CD25 en condiciones de heterocigosidad no es funcional. El resultado es similar con IL-2, en el que la línea +/- tiene un defecto de producción muy acusado, aunque en este caso si llega a ser significativamente distinto de la línea deficiente.

La deficiencia de MALT tiene un fenotipo similar, pero no está reportado que los heterocigotos de las mutaciones observadas en la misma tengan defectos tan acusados, tan solo un defecto en producción de IL-2 de en torno al 50% (McKinnon et al., 2014), no al 15% como observamos en nuestros resultados con BCL10. BCL10 no tiene función en el CBM más allá de constituir el esqueleto del filamento que forma el CBM, y MALT1 no puede funcionar si no está unido a él (David et al., 2018). Atendiendo a su papel en el ensamblaje del CBM, la disparidad entre los heterocigotos de MALT1 y BCL10 puede ser debida a que la cantidad de BCL10 sí es limitante para la oligomerización de CBM, mientras que los niveles MALT1 no son tan determinantes para su ensamblaje y función.

En el caso de los padres del paciente descrito de BCL10 (Torres et al., 2014), los *Western Blot* que se hicieron en blastos primarios mostraron una expresión normal de BCL10, por lo que no habría que esperar clínica de ellos.

Finalmente, en este bloque podemos concluir que la heterocigosidad de BCL10 podría ser considerada como un defecto autosómico dominante por haploinsuficiencia.





---

## **8.-Conclusiones**

---



## **CD247**

- Las líneas celulares humanas ZKO y PM1T son mejores modelos que la línea murina MA5.8 como sistema de evaluación de la patogenicidad de las mutaciones somáticas o germinales en CD247 sobre los niveles de expresión del TCR.
- No todas las reversiones somáticas restauran CD247 con la misma eficiencia, siendo Q70Y la variante con menor capacidad de reconstitución, comparada con Q70L y Q70W.
- La región citoplasmática de CD247 es imprescindible para la correcta expresión de CD247, y mutaciones en CD247 donde se pierda la mayor parte de esta región, como Q70X y Q101X, pueden presentar un comportamiento dominante negativo respecto a la proteína normal, lo que incrementaría su relevancia clínica.

## **BCL10**

- BCL10 es un elemento central de ciertas rutas de activación del linfocito T, ya que su ausencia impide la correcta producción de algunas citoquinas como IL-2, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , la inducción normal de los marcadores de activación ICOS y CD25 (pero no CD69) y del factor de transcripción IRF4 y la proteólisis de Regnasa-1, un represor de respuestas inflamatorias dependiente de BCL10.
- La comparación de las líneas deficientes homocigota y heterocigota de BCL10 indica que son necesarios unos niveles mínimos de BCL10 para que el complejo CBM señalice para la producción de IL-2, la expresión de CD25 y la proteólisis de Regnasa 1, pero no para la expresión de CD69.
- En los algoritmos diagnósticos de inmunodeficiencias primarias, la heterocigosidad de BCL10 debe ser considerada como autosómica dominante por haploinsuficiencia, como sugieren nuestro modelo celular.



---

## **9-Bibliografía**

---



- Abbas, A.K., Lichtman, A.H., and Pillai, S. (2007). Cellular and molecular immunology. Philadelphia: Elsevier.
- Al-Herz, W., Bousfiha, A., Casanova, J.L., Chatila, T., Conley, M.E., Cunningham-Rundles, C., Etzioni, A., Franco, J.L., Gaspar, H.B., Holland, S.M., *et al.* (2014). Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol* 5, 162.
- Alcantara-Montiel, J.C., Staines-Boone, T., Lopez-Herrera, G., Berron-Ruiz, L., Borrego-Montoya, C.R., and Santos-Argumedo, L. (2016). Somatic mosaicism in B cells of a patient with autosomal dominant hyper IgE syndrome. *Eur J Immunol* 46, 2438-2443.
- Altan-Bonnet, G., and Germain, R.N. (2005). Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses. *PLoS Biol* 3, e356.
- Arnaiz-Villena, A., Timon, M., Corell, A., Perez-Aciego, P., Martin-Villa, J.M., and Regueiro, J.R. (1992). Brief report: primary immunodeficiency caused by mutations in the gene encoding the CD3-gamma subunit of the T-lymphocyte receptor. *N Engl J Med* 327, 529-533.
- Arredondo-Vega, F.X., Santisteban, I., Richard, E., Bali, P., Koleilat, M., Loubser, M., Al-Ghonaum, A., Al-Helali, M., and Hershtfield, M.S. (2002). Adenosine deaminase deficiency with mosaicism for a "second-site suppressor" of a splicing mutation: decline in revertant T lymphocytes during enzyme replacement therapy. *Blood* 99, 1005-1013.
- Atkinson, T.P., Hall, C.G., Goldsmith, J., and Kirkham, P.M. (2003). Splice variant in TCRzeta links T cell receptor signaling to a G-protein-related signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 310, 761-766.
- Baens, M., Bonsignore, L., Somers, R., Vanderheydt, C., Weeks, S.D., Gunnarsson, J., Nilsson, E., Roth, R.G., Thome, M., and Marynen, P. (2014). MALT1 autoproteolysis is essential for NF-kappaB-dependent gene transcription in activated lymphocytes. *PLoS One* 9, e103774.
- Ban, S.A., Salzer, E., Eibl, M.M., Linder, A., Geier, C.B., Santos-Valente, E., Garncarz, W., Lion, T., Ott, R., Seelbach, C., *et al.* (2014). Combined immunodeficiency evolving into predominant CD4+ lymphopenia caused by somatic chimerism in JAK3. *J Clin Immunol* 34, 941-953.
- Beck-Garcia, K., Beck-Garcia, E., Bohler, S., Zorzini, C., Sezgin, E., Levental, I., Alarcon, B., and Schamel, W.W. (2015). Nanoclusters of the resting T cell antigen receptor (TCR) localize to non-raft domains. *Biochim Biophys Acta* 1853, 802-809.
- Blazquez-Moreno, A., Perez-Portilla, A., Agundez-Llaca, M., Dukovska, D., Vales-Gomez, M., Aydogmus, C., Ikinogullari, A., Regueiro, J.R., and Reyburn, H.T. (2017). Analysis of the recovery of CD247 expression in a PID patient: insights into the spontaneous repair of defective genes. *Blood* 130, 1205-1208.
- Brigida, I., Zoccolillo, M., Cicalese, M.P., Pfajfer, L., Barzaghi, F., Scala, S., Oleaga-Quintas, C., Alvarez-Alvarez, J.A., Sereni, L., Giannelli, S., *et al.* (2018). T-cell defects in patients with ARPC1B germline mutations account for combined immunodeficiency. *Blood* 132, 2362-2374.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 111, 967-979.
- Castro-Sanchez, P., Ramirez-Munoz, R., Martin-Cofreces, N.B., Aguilar-Sopena, O., Alegre-Gomez, S., Hernandez-Perez, S., Reyes, R., Zeng, Q., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., *et al.* (2018). Phosphatase of Regenerating Liver-1 (PRL-1)



- Regulates Actin Dynamics During Immunological Synapse Assembly and T Cell Effector Function. *Front Immunol* 9, 2655.
- Ciofani, M., Madar, A., Galan, C., Sellars, M., Mace, K., Pauli, F., Agarwal, A., Huang, W., Parkhurst, C.N., Muratet, M., *et al.* (2012). A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell* 151, 289-303.
- Crestani, E., Choo, S., Frugoni, F., Lee, Y.N., Richards, S., Smart, J., and Notarangelo, L.D. (2014). RAG1 reversion mosaicism in a patient with Omenn syndrome. *J Clin Immunol* 34, 551-554.
- Cui, X., Mino, T., Yoshinaga, M., Nakatsuka, Y., Hia, F., Yamasoba, D., Tsujimura, T., Tomonaga, K., Suzuki, Y., Uehata, T., *et al.* (2017). Regnase-1 and Roquin Nonredundantly Regulate Th1 Differentiation Causing Cardiac Inflammation and Fibrosis. *J Immunol* 199, 4066-4077.
- Currer, R., Van Duyne, R., Jaworski, E., Guendel, I., Sampey, G., Das, R., Narayanan, A., and Kashanchi, F. (2012). HTLV tax: a fascinating multifunctional co-regulator of viral and cellular pathways. *Front Microbiol* 3, 406.
- Dadi, H.K., Simon, A.J., and Roifman, C.M. (2003). Effect of CD3delta deficiency on maturation of alpha/beta and gamma/delta T-cell lineages in severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 349, 1821-1828.
- David, L., Li, Y., Ma, J., Garner, E., Zhang, X., and Wu, H. (2018). Assembly mechanism of the CARMA1-BCL10-MALT1-TRAF6 signalosome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 1499-1504.
- Davis, B.R., and Candotti, F. (2009). Revertant somatic mosaicism in the Wiskott-Aldrich syndrome. *Immunol Res* 44, 127-131.
- Davis, B.R., Dicola, M.J., Prokopishyn, N.L., Rosenberg, J.B., Moratto, D., Muul, L.M., Candotti, F., and Michael Blaese, R. (2008). Unprecedented diversity of genotypic revertants in lymphocytes of a patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood* 111, 5064-5067.
- de Saint Basile, G., Geissmann, F., Flori, E., Uring-Lambert, B., Soudais, C., Cavazzana-Calvo, M., Durandy, A., Jabado, N., Fischer, A., and Le Deist, F. (2004). Severe combined immunodeficiency caused by deficiency in either the delta or the epsilon subunit of CD3. *J Clin Invest* 114, 1512-1517.
- Demeyer, A., Staal, J., and Beyaert, R. (2016). Targeting MALT1 Proteolytic Activity in Immunity, Inflammation and Disease: Good or Bad? *Trends Mol Med* 22, 135-150.
- Dietrich, J., Kastrup, J., Lauritsen, J.P., Menne, C., von Bulow, F., and Geisler, C. (1999). TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly. *Eur J Immunol* 29, 1719-1728.
- Frizinsky, S., Rechavi, E., Barel, O., Najeeb, R.H., Greenberger, S., Lee, Y.N., Simon, A.J., Lev, A., Ma, C.A., Sun, G., *et al.* (2019). Novel MALT1 Mutation Linked to Immunodeficiency, Immune Dysregulation, and an Abnormal T Cell Receptor Repertoire. *J Clin Immunol* 39, 401-413.
- Fuchs, S., Rensing-Ehl, A., Pannicke, U., Lorenz, M.R., Fisch, P., Jeelall, Y., Rohr, J., Speckmann, C., Vraetz, T., Farmand, S., *et al.* (2015). Omenn syndrome associated with a functional reversion due to a somatic second-site mutation in CARD11 deficiency. *Blood* 126, 1658-1669.
- Fuehrer, M., Pannicke, U., Schuetz, C., Jacobsen, E.M., Schulz, A., Friedrich, W., Schwarz, K., and Honig, M. (2014). Successful haploidentical hematopoietic stem cell transplantation in a patient with SCID due to CD3epsilon deficiency: need for IgG-substitution 6 years later. *Klin Padiatr* 226, 149-153.

- Garcia-Gomez, S., Chaparro, R., Safa, A., Van Den Rym, A., Martinez-Barricarte, R., Lorenzo, L., Sanchez-Ramon, S., Toledano, V., Cubillos-Zapata, C., Lopez-Collazo, E., *et al.* (2019). Double-strand break repair through homologous recombination in autosomal-recessive BCL10 deficiency. *J Allergy Clin Immunol* *143*, 1931-1934.e1931.
- Garcillan, B., Mazariegos, M.S., Fisch, P., Res, P.C., Munoz-Ruiz, M., Gil, J., Lopez-Granados, E., Fernandez-Malave, E., and Regueiro, J.R. (2014). Enrichment of the rare CD4(+) gammadelta T-cell subset in patients with atypical CD3delta deficiency. *J Allergy Clin Immunol* *133*, 1205-1208.
- Gaud, G., Lesourne, R., and Love, P.E. (2018). Regulatory mechanisms in T cell receptor signalling. *Nature Reviews Immunology* *18*, 485-497.
- Gehring, T., Seeholzer, T., and Krappmann, D. (2018). BCL10 - Bridging CARDs to Immune Activation. *Front Immunol* *9*, 1539.
- Gil, J., Busto, E.M., Garcillan, B., Chean, C., Garcia-Rodriguez, M.C., Diaz-Alderete, A., Navarro, J., Reine, J., Mencia, A., Gurbindo, D., *et al.* (2011). A leaky mutation in CD3D differentially affects alphabeta and gammadelta T cells and leads to a Talpha-beta-Tgamma-delta+B+NK+ human SCID. *J Clin Invest* *121*, 3872-3876.
- Gobel, T.W., and Bolliger, L. (1998). The chicken TCR zeta-chain restores the function of a mouse T cell hybridoma. *J Immunol* *160*, 1552-1554.
- Gokturk, B., Keles, S., Kirac, M., Artac, H., Tokgoz, H., Guner, S.N., Caliskan, U., Caliskaner, Z., van der Burg, M., van Dongen, J., *et al.* (2014). CD3G gene defects in familial autoimmune thyroiditis. *Scand J Immunol* *80*, 354-361.
- Hermann-Kleiter, N., and Baier, G. (2010). NFAT pulls the strings during CD4+ T helper cell effector functions. *Blood* *115*, 2989-2997.
- Hermans, M.H., and Malissen, B. (1993). The cytoplasmic tail of the T cell receptor zeta chain is dispensable for antigen-mediated T cell activation. *Eur J Immunol* *23*, 2257-2262.
- Ismail, I.H., Dronyk, A., Hu, X., Hendzel, M.J., and Shaw, A.R. (2016). BCL10 is recruited to sites of DNA damage to facilitate DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* *15*, 84-94.
- Jabara, H.H., Ohsumi, T., Chou, J., Massaad, M.J., Benson, H., Megarbane, A., Chouery, E., Mikhael, R., Gorka, O., Gewies, A., *et al.* (2013). A homozygous mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) mutation in a family with combined immunodeficiency. *J Allergy Clin Immunol* *132*, 151-158.
- Jeltsch, K.M., Hu, D., Brenner, S., Zoller, J., Heinz, G.A., Nagel, D., Vogel, K.U., Rehage, N., Warth, S.C., Edelmann, S.L., *et al.* (2014). Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote T(H)17 differentiation. *Nat Immunol* *15*, 1079-1089.
- Jiang, J., Tang, W., An, Y., Tang, M., Wu, J., Qin, T., and Zhao, X. (2016). Molecular and immunological characterization of DNA ligase IV deficiency. *Clin Immunol* *163*, 75-83.
- Jing, H., Zhang, Q., Zhang, Y., Hill, B.J., Dove, C.G., Gelfand, E.W., Atkinson, T.P., Uzel, G., Matthews, H.F., Mustillo, P.J., *et al.* (2014). Somatic reversion in dedicator of cytokinesis 8 immunodeficiency modulates disease phenotype. *J Allergy Clin Immunol* *133*, 1667-1675.
- Juhas, U., Ryba-Stanislawowska, M., Szargiej, P., and Mysliwska, J. (2015). Different pathways of macrophage activation and polarization. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* *69*, 496-502.

- Juilland, M., and Thome, M. (2016). Role of the CARMA1/BCL10/MALT1 complex in lymphoid malignancies. *Curr Opin Hematol* 23, 402-409.
- Kasza, A., Wyrzykowska, P., Horwacik, I., Tymoszek, P., Mizgalska, D., Palmer, K., Rokita, H., Sharrocks, A.D., and Jura, J. (2010). Transcription factors Elk-1 and SRF are engaged in IL1-dependent regulation of ZC3H12A expression. *BMC Mol Biol* 11, 14.
- Kawai, T., Saito, M., Nishikomori, R., Yasumi, T., Izawa, K., Murakami, T., Okamoto, S., Mori, Y., Nakagawa, N., Imai, K., *et al.* (2012). Multiple reversions of an IL2RG mutation restore T cell function in an X-linked severe combined immunodeficiency patient. *J Clin Immunol* 32, 690-697.
- Kuijpers, T.W., van Leeuwen, E.M., Barendregt, B.H., Klarenbeek, P., van der Kerk, D.J., Baars, P.A., Jansen, M.H., de Vries, N., van Lier, R.A., and van der Burg, M. (2013). A reversion of an IL2RG mutation in combined immunodeficiency providing competitive advantage to the majority of CD8+ T cells. *Haematologica* 98, 1030-1038.
- Le Guen, T., Touzot, F., Andre-Schmutz, I., Lagresle-Peyrou, C., France, B., Kermasson, L., Lambert, N., Picard, C., Nitschke, P., Carpentier, W., *et al.* (2015). An in vivo genetic reversion highlights the crucial role of Myb-Like, SWIRM, and MPN domains 1 (MYSM1) in human hematopoiesis and lymphocyte differentiation. *J Allergy Clin Immunol* 136, 1619-1626.e1615.
- Lee, W.-I., Fan, W.-L., Lu, C.-H., Chen, S.-H., Kuo, M.-L. and Chang Gung, L. (in press). A novel CD3G mutation in a Taiwanese patient with normal T regulatory function presenting with the CVID phenotype free of antimmunity – analysis of all genotypes and phenotypes. *Frontiers*.
- Li, J., Vinh, D.C., Casanova, J.L., and Puel, A. (2017). Inborn errors of immunity underlying fungal diseases in otherwise healthy individuals. *Curr Opin Microbiol* 40, 46-57.
- Ma, C.A., Stinson, J.R., Zhang, Y., Abbott, J.K., Weinreich, M.A., Hauk, P.J., Reynolds, P.R., Lyons, J.J., Nelson, C.G., Ruffo, E., *et al.* (2017). Germline hypomorphic CARD11 mutations in severe atopic disease. *Nat Genet* 49, 1192-1201.
- Mao, R., Yang, R., Chen, X., Harhaj, E.W., Wang, X., and Fan, Y. (2017). Regnase-1, a rapid response ribonuclease regulating inflammation and stress responses. *Cell Mol Immunol* 14, 412-422.
- Marcus, N., Takada, H., Law, J., Cowan, M.J., Gil, J., Regueiro, J.R., Plaza Lopez de Sabando, D., Lopez-Granados, E., Dalal, J., Friedrich, W., *et al.* (2011). Hematopoietic stem cell transplantation for CD3delta deficiency. *J Allergy Clin Immunol* 128, 1050-1057.
- Marin, A.V., Jimenez-Reinoso, A., Briones, A.C., Munoz-Ruiz, M., Aydogmus, C., Pasick, L.J., Couso, J., Mazariegos, M.S., Alvarez-Prado, A.F., Blazquez-Moreno, A., *et al.* (2017). Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic mosaicism in CD247. *J Allergy Clin Immunol* 139, 347-349.e348.
- Marin, A.V.M., Garcillán, B., Jiménez-Reinoso, A., Muñoz-Ruiz, M., Briones, A.C., Fernández-Malavé, E., Recio, M.J., and Regueiro, J.R. (2014). Human congenital T-cell receptor disorders. *LymphoSign Journal* 2, 3-19.
- Martinez-Barricarte, R., de Jong, S.J., Markle, J., de Paus, R., Boisson-Dupuis, S., Bustamante, J., van de Vosse, E., Fleckenstein, B., and Casanova, J.L. (2016). Transduction of Herpesvirus saimiri-Transformed T Cells with Exogenous Genes of Interest. *Curr Protoc Immunol* 115, 7.21c.21-27.21c.12.

- McDermott, D.H., Gao, J.L., Liu, Q., Siwicki, M., Martens, C., Jacobs, P., Velez, D., Yim, E., Bryke, C.R., Hsu, N., *et al.* (2015). Chromothriptic cure of WHIM syndrome. *Cell* 160, 686-699.
- McKinnon, M.L., Rozmus, J., Fung, S.Y., Hirschfeld, A.F., Del Bel, K.L., Thomas, L., Marr, N., Martin, S.D., Marwaha, A.K., Priatel, J.J., *et al.* (2014). Combined immunodeficiency associated with homozygous MALT1 mutations. *J Allergy Clin Immunol* 133, 1458-1462, 1462.e1451-1457.
- Moncada-Velez, M., Velez-Ortega, A., Orrego, J., Santisteban, I., Jagadeesh, J., Olivares, M., Olaya, N., Hershfield, M., Candotti, F., and Franco, J. (2011). Somatic mosaicism caused by monoallelic reversion of a mutation in T cells of a patient with ADA-SCID and the effects of enzyme replacement therapy on the revertant phenotype. *Scand J Immunol* 74, 471-481.
- Morgan, N.V., Goddard, S., Cardno, T.S., McDonald, D., Rahman, F., Barge, D., Ciupek, A., Straatman-Iwanowska, A., Pasha, S., Guckian, M., *et al.* (2011). Mutation in the TCRalpha subunit constant gene (TRAC) leads to a human immunodeficiency disorder characterized by a lack of TCRalphabeta+ T cells. *J Clin Invest* 121, 695-702.
- Nishikomori, R., Akutagawa, H., Maruyama, K., Nakata-Hizume, M., Ohmori, K., Mizuno, K., Yachie, A., Yasumi, T., Kusunoki, T., Heike, T., *et al.* (2004). X-linked ectodermal dysplasia and immunodeficiency caused by reversion mosaicism of NEMO reveals a critical role for NEMO in human T-cell development and/or survival. *Blood* 103, 4565-4572.
- Okuno, Y., Hoshino, A., Muramatsu, H., Kawashima, N., Wang, X., Yoshida, K., Wada, T., Gunji, M., Toma, T., Kato, T., *et al.* (2015). Late-Onset Combined Immunodeficiency with a Novel IL2RG Mutation and Probable Revertant Somatic Mosaicism. *J Clin Immunol* 35, 610-614.
- Palendira, U., Low, C., Bell, A.I., Ma, C.S., Abbott, R.J., Phan, T.G., Riminton, D.S., Choo, S., Smart, J.M., Lougaris, V., *et al.* (2012). Expansion of somatically reverted memory CD8+ T cells in patients with X-linked lymphoproliferative disease caused by selective pressure from Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 209, 913-924.
- Peled, A., Sarig, O., Sun, G., Samuelov, L., Ma, C.A., Zhang, Y., Dimaggio, T., Nelson, C.G., Stone, K.D., Freeman, A.F., *et al.* (2019). Loss-of-function mutations in caspase recruitment domain-containing protein 14 (CARD14) are associated with a severe variant of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 143, 173-181.e110.
- Punwani, D., Wang, H., Chan, A.Y., Cowan, M.J., Mallott, J., Sunderam, U., Mollenauer, M., Srinivasan, R., Brenner, S.E., Mulder, A., *et al.* (2015). Combined immunodeficiency due to MALT1 mutations, treated by hematopoietic cell transplantation. *J Clin Immunol* 35, 135-146.
- Rebeaud, F., Hailfinger, S., Posevitz-Fejfar, A., Tapernoux, M., Moser, R., Rueda, D., Gaide, O., Guzzardi, M., Iancu, E.M., Rufer, N., *et al.* (2008). The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nat Immunol* 9, 272-281.
- Recio, M.J., Moreno-Pelayo, M.A., Kilic, S.S., Guardo, A.C., Sanal, O., Allende, L.M., Perez-Flores, V., Mencia, A., Modamio-Hoybjor, S., Seoane, E., *et al.* (2007). Differential biological role of CD3 chains revealed by human immunodeficiencies. *J Immunol* 178, 2556-2564.

- Rieux-Laucat, F., Hivroz, C., Lim, A., Mateo, V., Pellier, I., Selz, F., Fischer, A., and Le Deist, F. (2006). Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N Engl J Med* 354, 1913-1921.
- Roberts, J.L., Lauritsen, J.P., Cooney, M., Parrott, R.E., Sajaroff, E.O., Win, C.M., Keller, M.D., Carpenter, J.H., Carabana, J., Krangel, M.S., *et al.* (2007). T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* 109, 3198-3206.
- Rosebeck, S., Rehman, A.O., Lucas, P.C., and McAllister-Lucas, L.M. (2011). From MALT lymphoma to the CBM signalosome: three decades of discovery. *Cell Cycle* 10, 2485-2496.
- Rowe, J.H., Delmonte, O.M., Keles, S., Stadinski, B.D., Dobbs, A.K., Henderson, L.A., Yamazaki, Y., Allende, L.M., Bonilla, F.A., Gonzalez-Granado, L.I., *et al.* (2018). Patients with CD3G mutations reveal a role for human CD3gamma in Treg diversity and suppressive function. *Blood* 131, 2335-2344.
- Ruland, J., Duncan, G.S., Elia, A., del Barco Barrantes, I., Nguyen, L., Plyte, S., Millar, D.G., Bouchard, D., Wakeham, A., Ohashi, P.S., *et al.* (2001). Bcl10 is a positive regulator of antigen receptor-induced activation of NF-kappaB and neural tube closure. *Cell* 104, 33-42.
- Ruland, J., and Hartjes, L. (2019). CARD-BCL-10-MALT1 signalling in protective and pathological immunity. *Nat Rev Immunol* 19, 118-134.
- Schlauderer, F., Seeholzer, T., Desfosses, A., Gehring, T., Strauss, M., Hopfner, K.P., Gutsche, I., Krappmann, D., and Lammens, K. (2018). Molecular architecture and regulation of BCL10-MALT1 filaments. *Nat Commun* 9, 4041.
- Soudais, C., de Villartay, J.P., Le Deist, F., Fischer, A., and Lisowska-Grospierre, B. (1993). Independent mutations of the human CD3-epsilon gene resulting in a T cell receptor/CD3 complex immunodeficiency. *Nat Genet* 3, 77-81.
- Staal, J., Driege, Y., Haegman, M., Borghi, A., Hulpiau, P., Lievens, L., Gul, I.S., Sundararaman, S., Goncalves, A., Dhondt, I., *et al.* (2018). Ancient Origin of the CARD-Coiled Coil/Bcl10/MALT1-Like Paracaspase Signaling Complex Indicates Unknown Critical Functions. *Front Immunol* 9, 1136.
- Stepensky, P., Keller, B., Buchta, M., Kienzler, A.K., Elpeleg, O., Somech, R., Cohen, S., Shachar, I., Miosge, L.A., Schlesier, M., *et al.* (2013). Deficiency of caspase recruitment domain family, member 11 (CARD11), causes profound combined immunodeficiency in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* 131, 477-485.e471.
- Stewart, D.M., Candotti, F., and Nelson, D.L. (2007). The phenomenon of spontaneous genetic reversions in the Wiskott-Aldrich syndrome: a report of the workshop of the ESID Genetics Working Party at the XIIth Meeting of the European Society for Immunodeficiencies (ESID). Budapest, Hungary October 4-7, 2006. *J Clin Immunol* 27, 634-639.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.K., Xia, Z.P., and Chen, Z.J. (2004). The TRAF6 ubiquitin ligase and TAK1 kinase mediate IKK activation by BCL10 and MALT1 in T lymphocytes. *Mol Cell* 14, 289-301.
- Sussman, J.J., Bonifacio, J.S., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A.M., Saito, T., Klausner, R.D., and Ashwell, J.D. (1988). Failure to synthesize the T cell CD3-zeta chain: structure and function of a partial T cell receptor complex. *Cell* 52, 85-95.
- Sutlu, T., Nystrom, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S.E., and Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral

- transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther* 23, 1090-1100.
- Suzuki, S., Zhou, Y., Refaat, A., Takasaki, I., Koizumi, K., Yamaoka, S., Tabuchi, Y., Saiki, I., and Sakurai, H. (2010). Human T cell lymphotropic virus 1 manipulates interferon regulatory signals by controlling the TAK1-IRF3 and IRF4 pathways. *J Biol Chem* 285, 4441-4446.
- Takada, H., Nomura, A., Roifman, C.M., and Hara, T. (2005). Severe combined immunodeficiency caused by a splicing abnormality of the CD3delta gene. *Eur J Pediatr* 164, 311-314.
- Takeuchi, O. (2018). Endonuclease Regnase-1/Monocyte chemotactic protein-1-induced protein-1 (MCP1) in controlling immune responses and beyond. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 9.
- Tan, A.H., Wong, S.C., and Lam, K.P. (2006). Regulation of mouse inducible costimulator (ICOS) expression by Fyn-NFATc2 and ERK signaling in T cells. *J Biol Chem* 281, 28666-28678.
- Thome, M. (2008). Multifunctional roles for MALT1 in T-cell activation. *Nat Rev Immunol* 8, 495-500.
- Thome, M., Charton, J.E., Pelzer, C., and Hailfinger, S. (2010). Antigen receptor signaling to NF-kappaB via CARMA1, BCL10, and MALT1. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2, a003004.
- Tokgoz, H., Caliskan, U., Keles, S., Reisli, I., Guiu, I.S., and Morgan, N.V. (2013). Variable presentation of primary immune deficiency: two cases with CD3 gamma deficiency presenting with only autoimmunity. *Pediatr Allergy Immunol* 24, 257-262.
- Tone, Y., Wada, T., Shibata, F., Toma, T., Hashida, Y., Kasahara, Y., Koizumi, S., and Yachie, A. (2007). Somatic revertant mosaicism in a patient with leukocyte adhesion deficiency type 1. *Blood* 109, 1182-1184.
- Torres, J.M., Martinez-Barricarte, R., Garcia-Gomez, S., Mazariegos, M.S., Itan, Y., Boisson, B., Rholvarez, R., Jimenez-Reinoso, A., del Pino, L., Rodriguez-Pena, R., *et al.* (2014). Inherited BCL10 deficiency impairs hematopoietic and nonhematopoietic immunity. *J Clin Invest* 124, 5239-5248.
- Uzel, G., Tng, E., Rosenzweig, S.D., Hsu, A.P., Shaw, J.M., Horwitz, M.E., Linton, G.F., Anderson, S.M., Kirby, M.R., Oliveira, J.B., *et al.* (2008). Reversion mutations in patients with leukocyte adhesion deficiency type-1 (LAD-1). *Blood* 111, 209-218.
- Vales-Gomez, M., Estes, G., Aydogmus, C., Blazquez-Moreno, A., Marin, A.V., Briones, A.C., Garcillan, B., Garcia-Cuesta, E.M., Lopez Cobo, S., Haskologlu, S., *et al.* (2016). Natural killer cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient. *J Allergy Clin Immunol* 137, 942-945.e944.
- Wada, T., Konno, A., Schurman, S.H., Garabedian, E.K., Anderson, S.M., Kirby, M., Nelson, D.L., and Candotti, F. (2003). Second-site mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein gene causes somatic mosaicism in two WAS siblings. *J Clin Invest* 111, 1389-1397.
- Wada, T., Toma, T., Okamoto, H., Kasahara, Y., Koizumi, S., Agematsu, K., Kimura, H., Shimada, A., Hayashi, Y., Kato, M., *et al.* (2005). Oligoclonal expansion of T lymphocytes with multiple second-site mutations leads to Omenn syndrome in a patient with RAG1-deficient severe combined immunodeficiency. *Blood* 106, 2099-2101.

- Wiesmann, C., Leder, L., Blank, J., Bernardi, A., Melkko, S., Decock, A., D'Arcy, A., Villard, F., Erbel, P., Hughes, N., *et al.* (2012). Structural determinants of MALT1 protease activity. *J Mol Biol* 419, 4-21.
- Xie, J.W., Zhang, Z.Y., Wu, J.F., Liu, D.W., Liu, W., Zhao, Y., Jiang, L.P., Tang, X.M., Wang, M., and Zhao, X.D. (2015). In vivo reversion of an inherited mutation in a Chinese patient with Wiskott-Aldrich syndrome. *Hum Immunol* 76, 406-413.
- Zhang, H., Cordoba, S.P., Dushek, O., and van der Merwe, P.A. (2011). Basic residues in the T-cell receptor zeta cytoplasmic domain mediate membrane association and modulate signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19323-19328.
- Zhang, Q., Jing, H., and Su, H.C. (2016). Recent Advances in DOCK8 Immunodeficiency Syndrome. *J Clin Immunol* 36, 441-449.

---

## **10.-Anexos**

---





## **10.1.-Curriculum vitae**

### **FORMACIÓN ACADÉMICA**

**2014-2019:** Estudiante predoctoral. Programa de Doctorado en Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**2013-2014:** Máster universitario en Investigación en Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Nota media: 9.32.

**2007-2013:** Grado en Biología; mención Biología Sanitaria, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid. Nota media: 7.44.

### **EXPERIENCIA FORMATIVA**

**2016-2018:** Colaborador docente de la asignatura de Inmunología básica del grado de medicina en el Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Universidad Complutense de Madrid.

**2017:** Colaboración en la organización del desarrollo del proyecto de innovación educativa "Poster competition as learning tool in sciences" de la Universidad Complutense de Madrid.

### **EXPERIENCIA INVESTIGADORA**

**2017-2019:** Personal investigador en formación del Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Facultad de Medicina (UCM).

**2014-2017:** Estudiante predoctoral en el grupo de investigación "T cell physiopathology", Departamento de Inmunología, Oftalmología y ORL de la Facultad de Medicina (UCM).

**2013-2014:** Trabajo de Fin de Máster en el Departamento de Microbiología I de la Facultad de Medicina (UCM).

**2012-2013:** Trabajo fin de grado y prácticas de empresa realizados en el Departamento de Fisiología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas (UCM).

### **BECAS, CONTRATOS Y PROYECTOS**

**2017-2019:** Contrato predoctoral UCM para personal investigador en formación (CT27/16).

**2015-2017:** Investigador contratado a cargo del proyecto "Surface and intracellular T lymphocyte activation physiopathology" (SAF2014-54708-R, MINECO).

**2014- 2015:** Beca Fundación LAIR asociada al proyecto "Fisiopatología de la activación del linfocito T" del grupo de investigación "Inmunobiología Linfocitaria" perteneciente a Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre

(i+12) / Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid.  
Dirigido por: Dr. José Ramón Regueiro.

### PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Inmunobiología linfocitaria, UCM, Ref. 920631. Miembro del equipo de investigación desde 2013.

Surface and intracellular T lymphocyte activation physiopathology, MINECO, Ref. SAF2014-54708-R, 2015-17, Miembro del equipo de investigación.

Fisiopatología de la activación del linfocito T, MICINN, Ref. SAF2011-24235, 2012-2015. Miembro del equipo de investigación.

Fisiopatología de la activación del linfocito T, Fundación Lair, Ref. 2012/0070, 2012-15. Miembro del equipo de investigación.

### PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Bravo García-Morato M, Aracil Santos FJ, **Briones AC**, Blázquez Moreno A, Del Pozo Maté Á, Domínguez-Soto Á, Beato Merino MJ, Del Pino Molina L, Torres Canizales J, Marin AV, Vallespín García E, Feito Rodríguez M, Plaza López Sabando D, Jiménez-Reinoso A, Mozo Del Castillo Y, Sanz Santaefemia FJ, de Lucas-Laguna R, Cárdenas PP, Casamayor Polo L, Coronel Díaz M, Valés-Gómez M, Roldán Santiago E, Ferreira Cerdán A, Nevado Blanco J, Corbí ÁL, Reyburn HT, Regueiro JR, López-Granados E & Rodríguez Pena R. 2018 New human combined immunodeficiency caused by interferon regulatory factor 4 (IRF4) deficiency inherited by uniparental isodisomy. *J Allergy Clin Immunol*. 141(5):1924-1927.e18. IF 13.2 Q1.

Marín AV, Recio MJ, **Briones AC** & Regueiro JR. 2018. Conceptos básicos de inmunopatología: inmunidad e infección. En: *Diagnóstico y monitorización inmunológica de las inmunodeficiencias primarias y secundarias*. Ed. Elsevier España, Barcelona, pp 1-11. ISBN: 978-84-9022-885-2. eISBN: 978-84-9113-341-4.

Marin AV, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus C, Pasick LJ, Couso J, Mazariegos MS, Alvarez-Prado AF, Blázquez-Moreno A, Cipe FE, Haskologlu S, Dogu F, Morín M, Moreno-Pelayo MA, García-Sánchez F, Gil-Herrera J, Fernández-Malavé E, Reyburn HT, Ramiro AR, Ikinciogullari A, Recio MJ, Regueiro JR & Garcillán B. 2017. Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic 1 mosaicism in CD247. *J Allergy Clin Immunol*. 139(1):347-349.e8. IF 13.2 Q1.

Valés-Gómez M, Esteso G, Aydogmus C, Blázquez-Moreno A, Marín AV, **Briones AC**, Garcillán B, García-Cuesta E, López S, Haskologlu S, Moraru M, Cipe F, Dobbs K, Dogu F, Parolini S, Notarangelo LD, Vilches C, Recio MJ, Regueiro JR, Ikinciogullari A & Hugh Reyburn. 2015. NK cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient JACI. *J Allergy Clin Immunol*. 137(3):942-5.e4. IF 12.4 Q1

Garcillán B, Marin AVM, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, Muñoz-Ruiz M, García-León MJ, Gil J, Allende LM, Martínez-Naves E, Toribio ML & Regueiro JR. 2015.  $\gamma\delta$

T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies. *Front. Immunol.* 6:20. doi: 10.3389/fimmu.2015.00020. IF 5.69. Q1.

Marin AVM/Garcillán B/Jiménez-Reinoso A, Muñoz-Ruiz M, **Briones AC**, Fernández-Malavé E, Recio MJ & Regueiro JR. 2015. Human congenital T cell receptor disorders. *LymphoSign J* 2:3-19. Doi: dx.doi.org/10.14785/lpsn-2014-0012.

## PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS

### Congresos Internacionales

**Briones-Contreras A**, Chaparro-García R Regueiro JR & Cardenas P. Human CD247 germline and somatic mutations differentially modulate the surface expression of the T-cell antigen receptor (TCR) complex in human and mouse T cells. Comunicación oral. 18th Biennial Meeting of the European society of Immunodeficiencies (ESID). Lisboa, 2018.

Safa A, Perrig M, Marín Marin AV, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, Chaparro R, Román-Ortiz E, Cárdenas PP, Regueiro JR & Recio MJ. Defective replication stress response: a clue to the T-cell immunodeficiency in Schimke Immuno-Osseous Dysplasia (SIOD)? Poster. 18th Biennial Meeting of the European society of Immunodeficiencies (ESID). Lisboa, 2018.

Camps G, Muñoz J, **Briones AC**, García-Reino EJ, García-Gomez S, Pérez de Diego R, Regueiro JR & Recio MJ. A flow cytometry g-H2AX diagnostic method to measure DNA damage in peripheral blood mononuclear cells. Poster. 17th Biennial Meeting of the European society of Immunodeficiencies (ESID). Barcelona, 2016.

**Briones AC**, Marin AV, Jimenez-Reinoso A, Garcillan B, Cedeño R, López-Granados E, Gil J, de la Calle O, Recio MJ & Regueiro JR. Revertant T cells in human CD3delta deficiency. Poster. 4th European Congress of Immunology (ECI). Viena, 2015.

Marin AV, Juana-López L, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, ML Gaspar ML, de Andrés B, Rodríguez de Córdoba S & Regueiro JR. Altered B cell distribution but not CD21 phenotype in mouse models with secondary C3 deficiency. Poster. 4th European Congress of Immunology (ECI). Viena, 2015.

**Briones AC**, Marin AVM, Jimenez-Reinoso A, Garcillán B, Muñoz-Ruiz M, Fernández-Malavé E, Martínez-Naves E, Recio MJ & Regueiro JR.  $\gamma\delta$  T lymphocyte development and phenotype in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies. Poster. Thymus@Lisbon. Lisboa, 2015.

Recio MJ, Aydogmus C, Marin AVM, Haskologlu S, Jimenez-Reinoso A, Cipe F, **Briones-Contreras A**, Dogu F, Estes G, Valés-Gómez M, Reyburn HT, Ikinciogullari A & Regueiro JR. Complete deficiency of CD247, the  $\zeta$  chain of the T-cell antigen receptor and the NK Fc $\gamma$  receptor III. Poster. 16th Biennial Meeting of the ESID. Prague, 2014.

Recio M, Ramírez-Muñoz R, Torres-Canizales J, Garcillán B, Muñoz-Ruiz M, **Briones-Contreras A**, López-Granados E & Regueiro JR. Omenn-like syndrome associated with

mild defects in V(D)J recombination and TCR signaling. Poster. 16th Biennial Meeting of the ESID. Praga, 2014.

Nisembaum. LG **Briones-Contreras A**, González-Blázquez LA, Alonso-Gómez AL, Delgado MJ, Ana & Valenciano AI Dopamine modulates gut motility in goldfish (*Carassius auratus*) via D1-like receptors. Comunicación oral. 9th Congress of the Asociación Ibérica de Endocrinología Comparada (AIEC). Barcelona, 2013.

### Congresos nacionales

**Briones AC**, Chaparro García R, López-Nevado M, Marín AV, Regueiro JR & Cárdenas PP. Effect of germline and somatic CD247 mutations in the expression of the T-cell antigen receptor complex. Comunicación oral. 8ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM). Madrid, 2018.

Marin AV, Alonso-Domínguez C, Jiménez-Reinoso A, Muñoz-Martínez J, Mazariegos MS, **Briones AC**, Román-Ortiz E, Regueiro JR & Recio MJ. Normal T cell signaling and DNA repair in a Schimke immuno-osseous dysplasia patient with loss of the SMARCAL1 helicase domain. Poster. 40º congreso nacional de la Sociedad Española de Inmunología (SEI). Zaragoza, 2017.

**Briones AC**, Chaparro R, Lopez-Nevado M, Marin AV, Blázquez Moreno A, Reyburn HT, Regueiro JR & Cárdenas PP. Effect of germline and somatic CD247 mutations in the expression of the T-cell antigen receptor complex. Comunicación oral. 40º congreso nacional de la Sociedad Española de Inmunología (SEI). Zaragoza, 2017.

Muñoz-Martínez J, Domínguez-Alonso C, Marin AV, **Briones AC**, Ruiz-García R, González-Granado LI, Allende LM, Pérez De Diego R, Regueiro JR & Recio MJ. A flow cytometry gamma-H2AX diagnostic method to measure DNA damage in peripheral blood mononuclear cells. Poster. 40º congreso nacional de la Sociedad Española de Inmunología (SEI). Zaragoza, 2017.

Chaparro-García R, **Briones AC**, Marin AV, Blázquez-Moreno A, Reyburn HT, Regueiro JR & Cárdenas PP. Estudio del efecto de las mutaciones germinales y somáticas de CD247 en la expresión y función del receptor de antígeno de las células T (TCR). Poster 6ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM). Madrid, 2017.

**Briones AC**, Ramírez-Muñoz R, Torres-Canizales J, Garcillán G, Muñoz-Ruiz M, López-Granados E, regueiro JR & Recio MJ. Omenn-like syndrome associated with mild defects in V(D)J recombination and TCR signaling. Poster. 5ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM). Madrid, 2014.

**Briones AC**, Couso J, Reiné J, de Pablos JL, Rodríguez-Gallego JC, Regueiro JR & Recio MJ. Association of a CD3G gene variant with autoimmune disorders. Poster. 5ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM). Madrid, 2014.

Jiménez-Reinoso A, Marín AV, Mazariegos MS, Couso J, **Briones-Contreras A**, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus CY, Hocaoglu AB, Cipe FE, Ikinciogullari, A, Regueiro

JR & Garcillán B. Cytometry-based fast screening technique for TCR immunodeficiencies. Poster. 38 Congreso Nacional de Inmunología. Badajoz, 2014.

**Briones-Contreras A**, Mazariegos MS, Couso J, Marin AV, Jimenez-Reinoso A, Alvarez Prado AAP, Ramiro AR, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus CY, Hocaoglu AB, Cipe FE, Ikinciogullari A, Garcillan B, Regueiro JR & Recio, MJ. Molecular study of a new human CD247 deficiency. Comunicación oral. 38 Congreso Nacional de Inmunología. Badajoz, 2014.

Marin AVM, Jimenez-Reinoso A, Mazariegos MS, **Briones-Contreras A**, Alvarez-Prado AF, Ramiro AR, Couso J, Muñoz-Ruiz M, Gil J, Estes G, García-Cuesta EM, López-Cobo S, Agúndez-Llaca M, Dukovska D, Aydogmus C; Babayiğit Hocaoglu A, Cipe FE, Ikinciogullari A, Recio MJ, Valés-Gómez M, Reyburn HT, Garcillan B & Regueiro JR. Characterization of a complete deficiency of the T-cell antigen receptor and NK-cell Ig receptor  $\zeta$  chain (CD247). Comunicación oral. 38 Congreso Nacional de Inmunología. Badajoz 2014.

Mazariegos MS, Marín AVM, Jiménez-Reinoso A, Román E, **Briones-Contreras A**, Recio MJ & Regueiro JR. Normal T cell signaling in Schimke immuno-osseous dysplasia. Comunicación oral. 38 Congreso Nacional de Inmunología. Badajoz, 2014.

Marin AVM, **Briones A**, Jiménez-Reinoso A, Mazariegos MS, Muñoz-Ruiz M, Couso J, Aydogmus CY, Hocaoglu A, Cipe F, Recio MJ, Garcillán B & Regueiro JR. Characterization of a complete deficiency of the T-cell antigen receptor  $\zeta$  chain (CD247). Comunicación oral. 4ª Reunión Anual de la Sociedad de Inmunología de la Comunidad de Madrid (SICAM). Madrid, 2013.

**Briones A**, González LA & Valenciano AI. Modulación fisiológica de la motilidad intestinal por dopamina en el carpín: análisis de la expresión de los distintos subtipos de receptores implicados. Poster. VIII Jornadas Complutenses, VII Congreso Nacional De Investigación En Ciencias De La Salud Para Alumnos Pregraduados. Madrid, 2013.

## CURSOS

**2014:** “Bioinformática en Ciencias de la Salud” del programa de Formación Continuada del El Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre de Madrid.

**2014:** "Diagnóstico, terapias e investigación en enfermedades mediadas por el Sistema del Complemento" Organizado por el IdiPAZ.

**2014:** “Seguridad en gases en el interior de un laboratorio” Impartido por el Departamento de Formación de Praxair.

**2013:** “III Seminario de Formación en Protección Radiológica” Impartido por la Instalación Radiactiva Central de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

## **EVENTOS DE DIFUSIÓN CIENTÍFICA**

**2017 y 2018:** Participación en la Semana de la Ciencia de la Comunidad de Madrid en la actividad “El mundo microbiológico”.

Participación en el blog de divulgación científica MassScience.

## **OTROS MÉRITOS**

**2013-presente:** Miembro de la Sociedad Española de inmunología.

**2013-2014:** Representante de Estudiantes de Posgrado en el Consejo de Departamento de Microbiología I, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

## 10.2.-Publicaciones del autor relevantes para esta tesis

Durante el desarrollo de la presente tesis doctoral, el doctorando ha sido coautor de los siguientes artículos científicos de relevancia científica en el campo de estudio:

Bravo García-Morato M, Aracil Santos FJ, **Briones AC**, Blázquez Moreno A, Del Pozo Maté Á, Domínguez-Soto Á, Beato Merino MJ, Del Pino Molina L, Torres Canizales J, Marin AV, Vallespín García E, Feito Rodríguez M, Plaza López Sabando D, Jiménez-Reinoso A, Mozo Del Castillo Y, Sanz Santaefemia FJ, de Lucas-Laguna R, Cárdenas PP, Casamayor Polo L, Coronel Díaz M, Valés-Gómez M, Roldán Santiago E, Ferreira Cerdán A, Nevado Blanco J, Corbí ÁL, Reyburn HT, Regueiro JR, López-Granados E & Rodríguez Pena R. 2018 New human combined immunodeficiency caused by interferon regulatory factor 4 (IRF4) deficiency inherited by uniparental isodisomy. *J Allergy Clin Immunol*. 141(5):1924-1927.e18. IF 13.2 Q1.

Marin AV, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, Muñoz-Ruiz M, Aydogmus C, Pasick LJ, Couso J, Mazariegos MS, Alvarez-Prado AF, Blázquez-Moreno A, Cipe FE, Haskologlu S, Dogu F, Morín M, Moreno-Pelayo MA, García-Sánchez F, Gil-Herrera J, Fernández-Malavé E, Reyburn HT, Ramiro AR, Ikinciogullari A, Recio MJ, Regueiro JR & Garcillán B. 2017. Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic 1 mosaicism in CD247. *J Allergy Clin Immunol*. 139(1):347-349.e8. IF 13.2 Q1.

Valés-Gómez M, Estes G, Aydogmus C, Blázquez-Moreno A, Marín AV, **Briones AC**, Garcillán B, García-Cuesta E, López S, Haskologlu S, Moraru M, Cipe F, Dobbs K, Dogu F, Parolini S, Notarangelo LD, Vilches C, Recio MJ, Regueiro JR, Ikinciogullari A & Hugh Reyburn. 2015. NK cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient JACI. *J Allergy Clin Immunol*. 137(3):942-5.e4. IF 12.4 Q1

Garcillán B, Marin AVM, Jiménez-Reinoso A, **Briones AC**, Muñoz-Ruiz M, García-León MJ, Gil J, Allende LM, Martínez-Naves E, Toribio ML & Regueiro JR. 2015.  $\gamma\delta$  T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies. *Front. Immunol*. 6:20. doi: 10.3389/fimmu.2015.00020. IF 5.69. Q1.





## Letter to the Editor

# New human combined immunodeficiency caused by interferon regulatory factor 4 (*IRF4*) deficiency inherited by uniparental isodisomy

To the Editor:

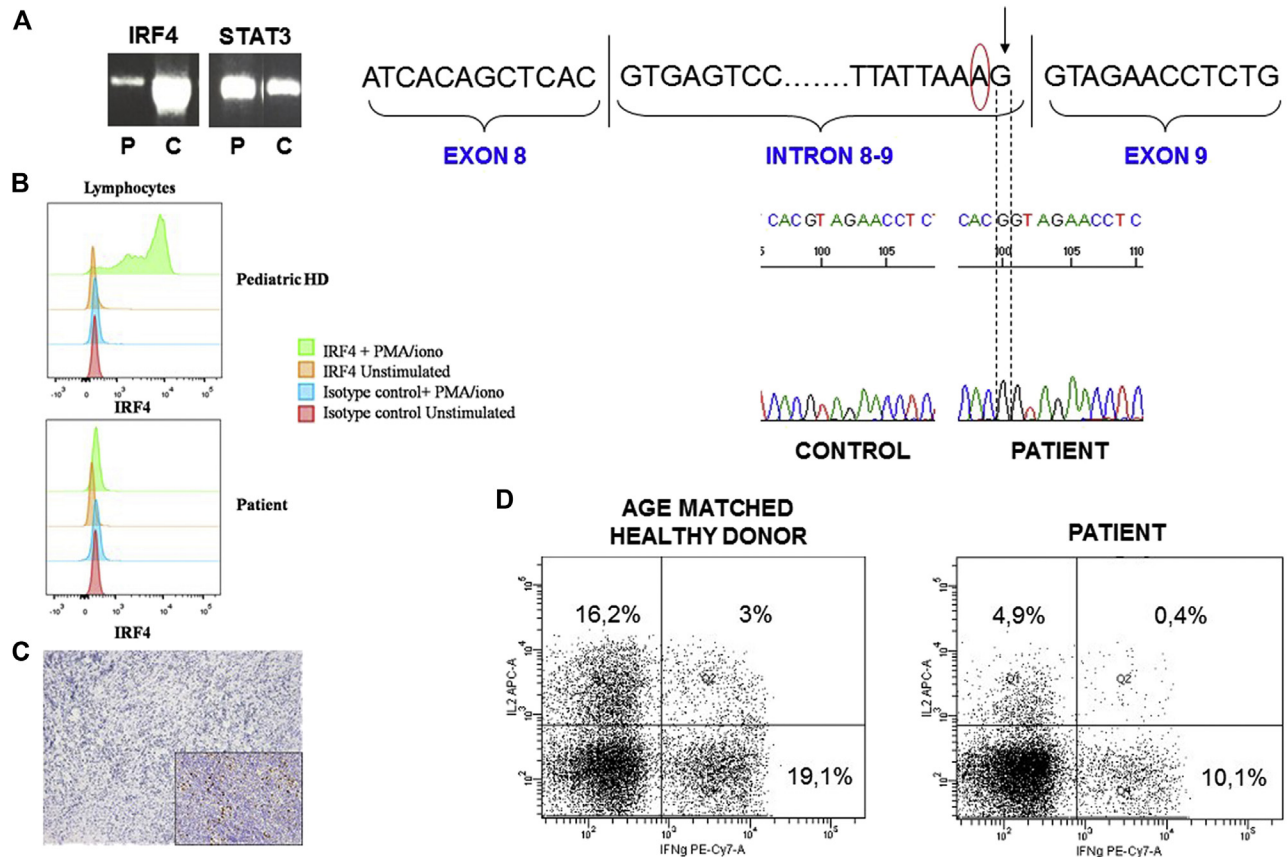
Primary immunodeficiencies (PIDs) are a group of around 300 rare and usually monogenic disorders, mostly caused by point mutations.<sup>1</sup> Uniparental disomy (UPD) is a condition in which both copies of a chromosome or chromosomal region are inherited from the same progenitor.<sup>2</sup> Uniparental isodisomy (UPID) is a type of UPD caused by nondisjunction errors in one of the parental gametes in meiosis II. UPID can be pathogenic, either because of imprinting defects or inheritance of a recessive condition from a single carrier parent.

Interferon regulatory factor 4 (*IRF4*) is one of 9 members of the *IRF* family of transcription factors, which participate in

transcriptional regulation in response to interferon.<sup>3</sup> In 1997, an *IRF4*-deficient mouse was described that showed severe immune alterations.<sup>4</sup> The many roles of *IRF4* in immune functions have been thoroughly analyzed, although all published studies to date used either mouse models or immortalized cell lines, and some inconsistencies have been noted. *IRF4* appears to be a key regulator of several major processes in B lymphocytes,<sup>5,6</sup> T lymphocytes,<sup>7</sup> and myeloid cells.<sup>8</sup> It is also expressed in nonimmune cells and has been shown recently to mediate important nonimmune functions, affecting the brain, heart, and adipose tissue.<sup>9</sup>

Here we describe a patient with a new combined PID caused by a homozygous splicing mutation in *IRF4* (MIM: 601900) located on chromosome 6p25.3. The genetic mechanism underlying the defect consisted of a maternal UPID that led to inheritance of 2 identical maternal sister chromatids.

The patient was a 5-month-old Spanish girl born to non-consanguineous parents. Her clinical course was characterized by intrauterine growth retardation, severe dermatitis, and failure to



**FIG 1.** *IRF4* mutation, protein detection, and cytokine expression profile. **A, Left,** *IRF4*-specific RT-PCR of the patient (P) and a healthy donor (C). Signal transducer and activator of transcription 3 (*STAT3*) was amplified in parallel as a loading control. **Right,** Scheme of the effect of the splicing mutation c.1213-2A>G at the mRNA level. The oval marks the mutated nucleotide, and the arrow indicates the intronic nucleotide that is introduced into the mRNA. **B,** *IRF4* expression in total lymphocytes either alone or stimulated with PMA/ionomycin (16 hours). Data are from a single experiment. **C,** The patient's cells in a lymph node biopsy specimen did not react with MUM1 (anti-*IRF4* mAb). **Inset,** Biopsy specimen from an age-matched control subject showed MUM1-positive cells (both original magnification  $\times 200$ ). Data are from a single experiment. **D,** Intracellular IL-2 and IFN- $\gamma$  production in PBMCs from the patient and an age-matched healthy donor after PMA/ionomycin stimulation (6 hours). Data are from a single experiment.

**TABLE I.** Immune phenotype comparison between IRF4-deficient patients and IRF4 knockout mice

Cell type	Human IRF4 deficiency (this report)	<i>Irf4</i> <sup>-/-</sup> mice	References
B cells	Normal bone marrow early B-cell development	Normal bone marrow early B-cell development	4
	Low immature B lymphocytes with high $\kappa/\lambda$ ratio	High $\kappa/\lambda$ ratio in spleen B lymphocytes	
	Low percentage of total and memory B lymphocytes in peripheral blood	Late spleen B-cell maturation block	4
	No primary B-cell follicles or germinal centers in lymph nodes	Primary B-cell follicles present but no germinal centers in spleens or lymph nodes	4
	No plasma cells in bone marrow or lymph nodes	No plasma cells in spleen or lamina propria	4
T cells	No serum IgG, IgA, IgM, or IgE	No serum immunoglobulin isotypes	4
	No vaccination response to tetanus and diphtheria	No antibodies after dinitrophenol immunization	4
	No <i>in vitro</i> immunoglobulin secretion in response to PWM	No <i>in vitro</i> immunoglobulin secretion in response to LPS or anti-CD40	4
	Polyclonal T-cell repertoire	Normal distribution of several TCR V $\beta$ elements	4
	Low proliferative response to PHA and normal to anti-CD3, ConA, and PWM	Low proliferative response to anti-CD3, ConA, and staphylococcal enterotoxin A	4
	Low IL-2 and IFN- $\gamma$ production in response to PMA/ionomycin or anti-CD3	Low IL-2, IFN- $\gamma$ , and IL-4 production in response to anti-CD3	4
	Normal IL-4 production in response to PMA/ionomycin		
Monocytes, macrophages, dendritic cells	Very low T <sub>H</sub> 17 and Treg and low T <sub>H</sub> 2 and T <sub>FH</sub> cell numbers	Diminished T <sub>H</sub> 2, T <sub>H</sub> 17, and T <sub>FH</sub> differentiation <i>in vitro</i>	7, E11
	Impaired M-CSF-induced polarization	Impaired <i>Irf4</i> <sup>-/-</sup> Treg cell function	
	Impaired MoDC differentiation <i>in vitro</i>	Impaired M-CSF-induced polarization	8, E13
Granulocytes	High percentage of plasmacytoid dendritic cells HLA-DR <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD123 <sup>+</sup> in bone marrow	Absence of cDC2s (CD11b <sup>high</sup> CD8 $\alpha$ <sup>-</sup> ) and presence of cDC1s (CD11b <sup>low</sup> CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> ) <i>in vivo</i>	
	Eosinophilia without hyper-IgE	Undocumented	—
All	Susceptibility to infection	Undocumented	—

cDC, Conventional dendritic cell; ConA, concanavalin A; PWM, pokeweed mitogen.

thrive, with long periods of fever without focus and tachycardia. Before starting prophylactic therapy at 5 months, she experienced bronchopneumonia, mugueta, and diarrhea. She had generalized adenopathies on several occasions. She had episodes of fast hypoglycemia and excessive sweating. She died at 2 years of age on day +2 after an allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. See the complete case report in the **Methods** section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org) for more details.

On immunologic evaluation, she had agammaglobulinemia with reduced B-cell percentages, normal total lymphocyte counts, and hypereosinophilia in peripheral blood (see **Table E1** in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Memory B-cell subsets were absent, and the  $\kappa/\lambda$  ratio was abnormal (8:1; see **Fig E1**, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). For CD4 T cells, a large percentage of recent thymic emigrants was found, effector memory cell counts were low (see **Fig E1**, B), and only a small percentage of regulatory T (Treg) cells were observed (see **Fig E1**, C). T<sub>H</sub> lymphocyte subsets showed increased T<sub>H</sub>1, reduced T<sub>H</sub>2, and strongly decreased T<sub>H</sub>17 and follicular helper T (T<sub>FH</sub>) subsets (see **Fig E2** in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). CD8 effector memory T cells were undetectable (see **Fig E1**, D). Natural killer (NK) cell counts were normal (see **Table E2** in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)) and did not show degranulation abnormalities.

In the patient's bone marrow, reduced B-cell numbers with the absence of memory B-cell subsets and plasma cells were noted. An abnormal  $\kappa/\lambda$  ratio (8:1) was also present (see **Fig E3** in the Online Repository). Hypoplasia of the granulocytic lineage with

an increase in numbers of plasmacytoid dendritic cells, abundance of eosinophils, and hemophagocytosis were observed.

Examination of the lymph nodes showed a loss of normal architecture caused by a lack of follicles, as well as patchy areas of necrosis and abscess formation (see **Fig E4**, A and B, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Large numbers of eosinophils and CD4<sup>+</sup> lymphocytes were found (see **Fig E4**, C). Plasma cells were absent (see **Fig E4**, D). B lymphocytes were around 10%, and they were dispersed through the lymph nodes (see **Fig E4**, E).

Genetic analysis using a next-generation sequencing (NGS)—customized panel allowed us to exclude mutations in all previously reported PID-related genes. Because of the complexity of the clinical manifestations, a single nucleotide polymorphism (SNP) array was performed with DNA from the patient and her parents. A significant loss of heterozygosity with normal gene dosage was found affecting the totality of chromosome 6. Results were compatible with a maternal UPID of chromosome 6 (see **Fig E5**, A, in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). The patient's chromosome 6 and that of her mother were analyzed by using whole-exome sequencing (WES). The mutation c.1213-2A>G, p.V405GfsTer127 (NM\_001195286) in the gene *IRF4*, which is located in the splice acceptor site of intron 8, was found in homozygosity in the patient and in heterozygosity in her mother and grandmother (see **Fig E5**, B).

By using RT-PCR, an alteration of the *IRF4* mRNA sequence was demonstrated (**Fig 1**, A). *IRF4* induction was absent by using flow cytometry in the patient's lymphocytes after stimulation (**Fig 1**, B). *IRF4* expression was absent in lymph node biopsy specimens, as determined by using immunohistochemistry (**Fig 1**, C).

To demonstrate the pathologic role of IRF4 deficiency, IFN- $\gamma$  production was analyzed by using intracellular flow cytometry in the patient's T lymphocytes (Fig 1, D) and in the patient's human T-lymphotropic virus 1 (HTLV-1) cell line (see Fig E6 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)) before and after transduction with wild-type *IRF4*. Similar to her primary cells, the *Irf4*<sup>-/-</sup> HTLV-1 cell line produced low IFN- $\gamma$  levels, whereas after IRF4 transduction, IFN- $\gamma$  levels remained comparable with those in the control HTLV-1 cell line.

Regarding myeloid lineage cell differentiation, quantitative RT-PCR of a set of genes that specifically define the macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)-induced macrophage (M- $\phi$ ) subset was performed in the patient's macrophages. Compared with M- $\phi$ s from healthy donors, the patient's M- $\phi$ s had lower expression of all genes studied (*FOLR2*, *HTR2B*, *ADORA3*, *CD209*, and *SLC40A1*), except *MAFB*, and higher expression of genes associated with proinflammatory GM-CSF-induced macrophage (GM- $\phi$ ) polarization (see Fig E7 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). An inadequate differentiation of monocytes toward monocyte-derived dendritic cells (MoDCs) was also observed based on the lack of CD1a (see Fig E8 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

We describe a new autosomal recessive combined PID caused by IRF4 deficiency in a girl with severe dermatitis generated by a maternal UPID of chromosome 6 and characterized by agammaglobulinemia; eosinophilia; normal lymphocyte counts; reduction in memory T- and B-cell compartments; alteration of the  $\kappa/\lambda$  ratio; severely reduced Treg, T<sub>H</sub>17, and T<sub>FH</sub> subsets; and increased GM- $\phi$  macrophage polarization.

IRF4 deficiency as the pathogenic event underlying the patient's immunologic impairment is reinforced by comparison with the phenotypic characteristics of distinct *Irf4*<sup>-/-</sup> mouse models, which are strikingly similar to those of the patient (Table I).<sup>4,7,8,E11,E13</sup>

IRF4 deficiency can be also implicated in other clinical manifestations, such as severe fast hypoglycemia, failure to thrive, excessive sweating, or tachycardia, although more studies should be performed. See the Discussion section in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org) for more details.

We thank the patient and her family. We also thank Drs Luis Allende for characterizing the T-cell repertoire, Antonio Balas for maternal engraftment analysis, and Miguel Muñoz and Noelia Carballeda for their help in IL-4 and IL-5 determinations. We thank C Mark for editorial assistance.

Maria Bravo García-Morato, BSc<sup>a,b</sup>  
Francisco Javier Aracil Santos, MD<sup>c,\*</sup>  
Alejandro Contreras Briones, BSc<sup>d,\*</sup>  
Alfonso Blázquez Moreno, BSc<sup>e</sup>  
Ángela del Pozo Maté, BSc<sup>f</sup>  
Ángeles Domínguez-Soto, PhD<sup>g</sup>  
María José Beato Merino, MD<sup>h</sup>  
Lucía del Pino Molina, PhD<sup>a,b</sup>  
Juan Torres Canizales, MD<sup>a,b</sup>  
Ana Victoria Marin, BSc<sup>d</sup>  
Elena Vallespín García, PhD<sup>f</sup>  
Marta Feito Rodríguez, MD, PhD<sup>i</sup>  
Diego Plaza López Sabando, MD<sup>j</sup>  
Anaïs Jiménez-Reinoso, PhD<sup>d</sup>  
Yasmina Mozo del Castillo, MD<sup>j</sup>  
Francisco José Sanz Santaefemía, MD<sup>k</sup>

Raúl de Lucas-Laguna, MD<sup>j</sup>  
Paula P. Cárdenas, PhD<sup>d</sup>  
Laura Casamayor Polo, BSc<sup>a</sup>  
María Coronel Díaz, BSc<sup>a</sup>  
Mar Valés-Gómez, PhD<sup>e</sup>  
Ernesto Roldán Santiago, PhD<sup>j</sup>  
Antonio Ferreira Cerdán, MD, PhD<sup>a,b</sup>  
Julián Nevado Blanco, PhD<sup>f</sup>  
Ángel L. Corbí, PhD<sup>g</sup>  
Hugh T. Reyburn, PhD<sup>e</sup>  
José Ramón Regueiro, PhD<sup>d</sup>  
Eduardo López-Granados, MD, PhD<sup>a,b</sup>  
Rebeca Rodríguez Pena, MD, PhD<sup>a,b</sup>

From the Departments of <sup>a</sup>Immunology, <sup>b</sup>Pediatrics, <sup>c</sup>Pathologic Anatomy, <sup>d</sup>Dermatology, and <sup>e</sup>Pediatric Hematology/Oncology, Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>f</sup>the Lymphocyte Pathophysiology Group, La Paz Institute of Biomedical Research, IdiPAZ, Madrid, Spain; <sup>g</sup>the Department of Microbiology I (Immunology), School of Medicine, Universidad Complutense de Madrid, 12 de Octubre Health Research Institute (imas12), Madrid, Spain; <sup>h</sup>the Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain; <sup>i</sup>the Institute of Medical and Molecular Genetics (IN-CEMM), <sup>j</sup>the Myeloid Cell Laboratory, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain; <sup>k</sup>the Department of Pediatrics, Hospital Universitario Niño Jesús, Madrid, Spain; and <sup>l</sup>the Department of Immunology, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. E-mail: [maria.bravo@salud.madrid.org](mailto:maria.bravo@salud.madrid.org).

\*These authors contributed equally to this work.

A.B.M. received a fellowship from the Spanish MINECO (SVP-2014-068263). A.J.-R. was supported by the MINECO (FPI BES-2012-055054). A.V.M. was supported by the Comunidad de Madrid (CAM S2010/BMD-2316) and the Complutense University (CT46/15-Harvard Univ). A.B.C. was supported by the Complutense University (CT28/16). P.C. was supported by the MINECO (152JA19262). This work was supported by grants from the Spanish Association Against Cancer (AECC) and Carlos III Health Institute P116/01605) to E.L.-G. and the MINECO SAF2014-58752-R to H.T.R., SAF2015-69169-R to M.V.G., and SAF2014-54708-R to J.R.R.).

Disclosure of potential conflict of interest: A. Blázquez Moreno's institution has received grant funding from MINEICO (SVP-2014-068263). A. del Pozo Maté has received consultancy fees from ENAC and lecture fees from the Health Institute Carlos III. E. Vallespín García has received funds for expert testimony for the Scienceboard.net and royalties from KARYOARRAY-8.512.907. M. Valés-Gómez's institution has received grant funding from MINEICO (SAF2015-69169-R) and Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2326). H. T. Reyburn's institution has received a grant from MINEICO (SAF2014-58752-R). The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## REFERENCES

- Picard C, Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova J-L, Chatila T, Conley ME, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *J Clin Immunol* 2015;35:696-726.
- Yamazawa K, Ogata T, Ferguson-Smith AC. Uniparental disomy and human disease: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2010;154C:329-33.
- Zhao GN, Jiang DS, Li H. Interferon regulatory factors: at the crossroads of immunity, metabolism, and disease. *Biochim Biophys Acta* 2015;1852:365-78.
- Mittrücker HW, Matsuyama T, Grossman A, Kündig TM, Potter J, Shahinian A, et al. Requirement for the transcription factor LSIRF/IRF4 for mature B and T lymphocyte function. *Science* 1997;275:540-3.
- Nutt SL, Taubenheim N, Hasbold J, Corcoran LM, Hodgkin PD. The genetic network controlling plasma cell differentiation. *Semin Immunol* 2011;23:341-9.
- Pathak S, Ma S, Trinh L, Lu R. A role for interferon regulatory factor 4 in receptor editing. *Mol Cell Biol* 2008;28:2815-24.
- Huber M, Lohoff M. IRF4 at the crossroads of effector T-cell fate decision. *Eur J Immunol* 2014;44:1886-95.
- Satoh T, Takeuchi O, Vandenbon A, Yasuda K, Tanaka Y, Kumagai Y, et al. The Jmjd3-Irf4 axis regulates M2 macrophage polarization and host responses against helminth infection. *Nat Immunol* 2010;11:936-44.
- Kong X, Banks A, Liu T, Kazak L, Rao RR, Cohen P, et al. IRF4 is a key thermogenic transcriptional partner of PGC-1 $\alpha$ . *Cell* 2014;158:69-83.

<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.12.995>





## Primary T-cell immunodeficiency with functional revertant somatic mosaicism in *CD247*



To the Editor:

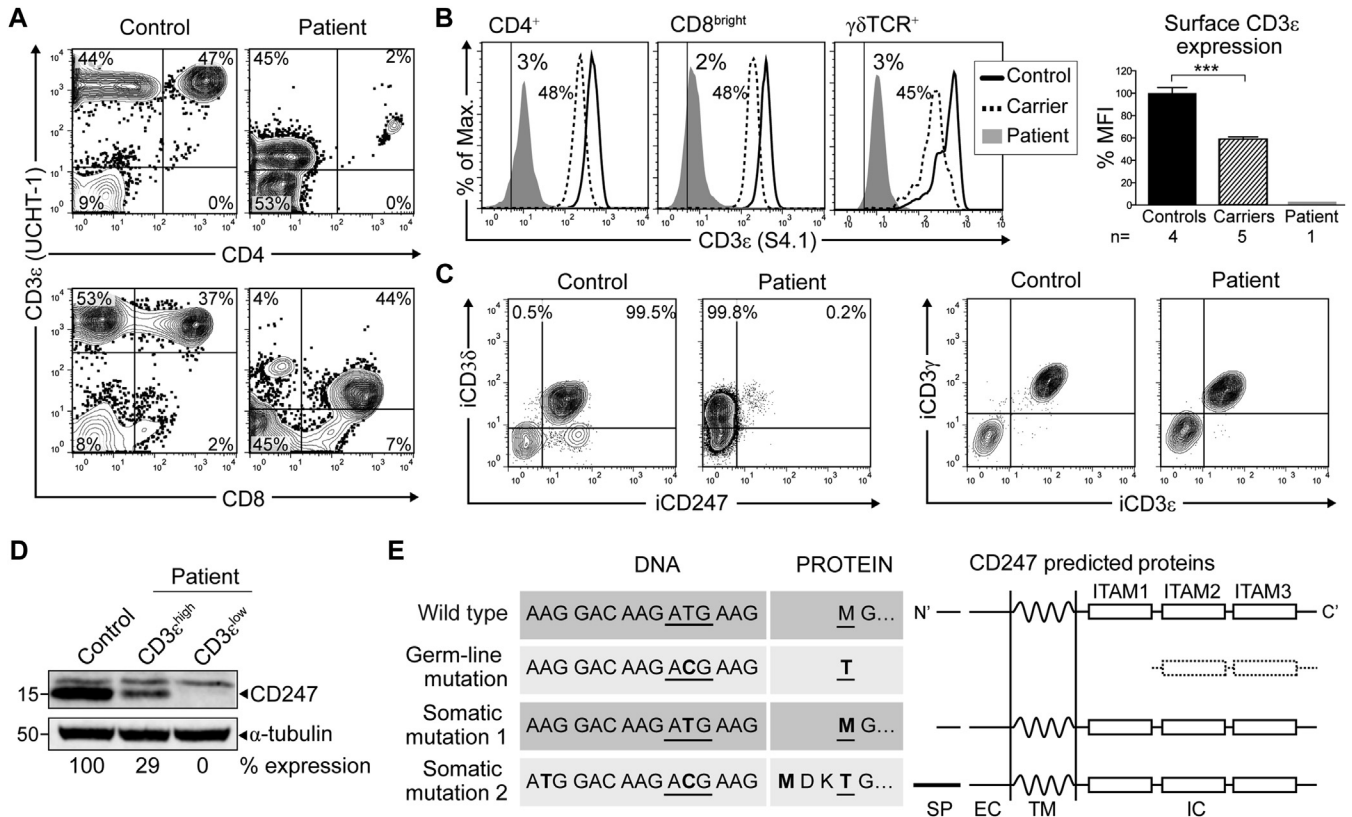
T lymphocytes detect antigens with the T-cell receptor (TCR) composed of a variable heterodimer (either  $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$ ), 2 invariant heterodimers ( $CD3\gamma\epsilon$  and  $CD3\delta\epsilon$ ), and an invariant homodimer ( $CD247$  or  $\zeta\zeta$ ).<sup>1</sup> Because of the crucial role of TCR signaling in thymic selection, mutations in *TCR*, *CD3*, or *CD247* selectively impair T-cell development, albeit to different degrees: deficiency of  $CD3\delta$  or  $CD3\epsilon$ , but not of  $CD3\gamma$  or  $CD247$ , causes severe T-cell lymphopenia. Their clinical outcome is also disparate, because  $CD3\gamma$  deficiency does not require urgent transplantation. Thus, TCR immunodeficiencies display a range of phenotypes and careful differential diagnosis is essential for appropriate therapy.

We describe an infant born to consanguineous parents with early-onset chronic cytomegalovirus infection, severe immunodeficiency, and extremely low surface TCR levels. Her immunologic characterization at age 11 months is summarized in Table E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org).

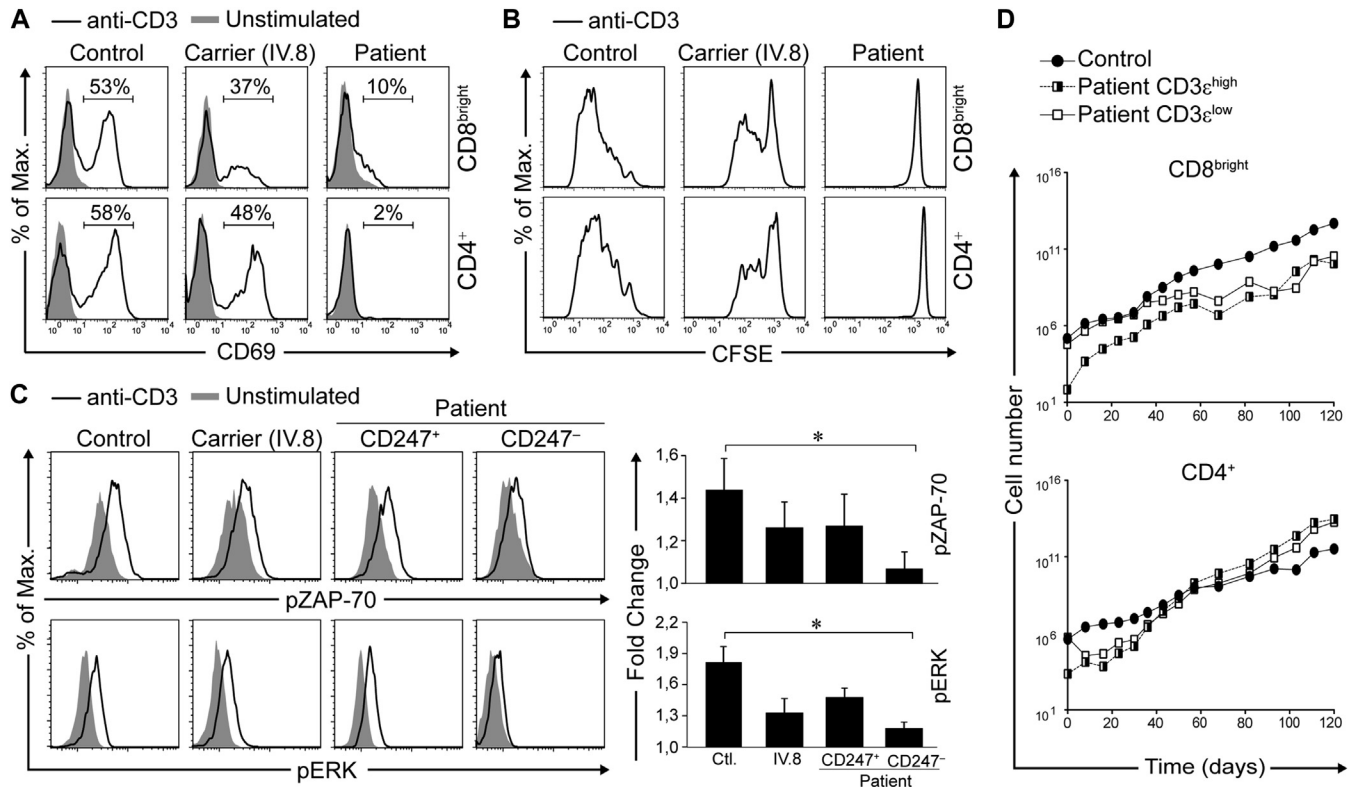
Briefly, she showed low T- and B-cell counts, selective severe  $CD4^+$  T-cell lymphopenia (Fig 1, A), low recent thymic emigrants, and naive T cells and poor TCRV $\beta$  repertoire, all suggestive of a defect in T-cell development despite a normalized thymus (see Fig E1 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)).

Surface TCR expression was markedly reduced in both  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T cells (Fig 1, B), suggesting a defect in an invariant chain of the TCR complex. Intracellular (i) flow cytometry showed normal  $CD3\gamma$ ,  $\delta$ , and  $\epsilon$  expression but almost absolute absence of  $CD247$  (Fig 1, C). cDNA sequencing revealed a homozygous T-to-C mutation at position +2 of exon 1 of *CD247* as reported recently<sup>2</sup> (NCBI/ClinVar: rs672601318), which causes loss of the initiation codon and therefore prevents translation. The patient's parents and 4 additional family members were asymptomatic but heterozygous for the mutation (see Fig E2 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Interestingly, surface TCR expression in mutation carriers was reduced 2-fold (Fig 1, B), revealing a clear correlation between surface TCR and *CD247* genotype, which was useful for diagnosis and genetic counseling.

Notably, a few T cells in the patient expressed surface TCR levels (Fig 1, A) comparable to those of carriers ( $CD3\epsilon^{high}$ ), which



**FIG 1.** Patient characterization. **A**, Peripheral blood phenotype. **B**, Surface  $CD3\epsilon$  expression in the indicated subsets. Numbers indicate % MFI relative to controls. **C**, Intracellular (i) expression of the indicated CD. Numbers indicate %  $iCD247^-$  or  $iCD247^+$  in  $iCD3\delta^+$  (T) cells. **D**,  $CD247$  WB of sorted T cells. Numbers indicate % normalized band intensity relative to control. **E**, Mutations and predicted proteins. EC, Extracellular; IC, intracellular; MFI, mean fluorescence intensity; SP, signal peptide; TM, transmembrane; WB, Western blot. \*\*\* $P \leq .001$ .



**FIG 2.** Impaired TCR-induced signaling in primary (**A** and **B**) and cultured T cells (**C** and **D**). % CD69<sup>+</sup> cells (Fig 2, **A**) or CFSE dilution (Fig 2, **B**) after stimulation with anti-CD3 $\epsilon$  for 24 hours or 5 days, respectively. **C**, Representative pZAP-70 and pERK levels after stimulation with anti-CD3 $\epsilon$  (left) and MFI + SEM relative to unstimulated cells of 4 independent experiments (right). **D**, T-cell growth in allogeneic cultures. CFSE, Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; pERK, phospho-extracellular signal-regulated kinase. \* $P \leq .05$ .

correlated with the rare CD247<sup>+</sup> T-cell subset (0.2%, Fig 1, **C**). To confirm this correlation, T cells from the patient were cultured in allogeneic cultures, where CD3 $\epsilon^{\text{high}}$  T cells became prominent (see Fig E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). Fluorescence-activated cell sorting and CD247 Western blot analysis confirmed that the patient's CD3 $\epsilon^{\text{high}}$  T cells had recovered CD247 expression (Fig 1, **D**). RNA sequencing of CD3 $\epsilon^{\text{high}}$  T cells revealed 2 independent somatic mutations at or near the germline mutation: a reversion (c.2T>C>T) and a second-site mutation (c.-8A>T) that generates an alternative in-frame initiation codon, 3 codons upstream of the original ATG (Fig 1, **E**). Given the low frequency of revertant T cells *in vivo*, it seems improbable that a single cell would carry both somatic mutations.

Collectively, these results show that a very small percentage of the patient's T cells had undergone somatic mutations able to revert the inherited mutation, allowing CD247 protein synthesis and thus higher surface TCR expression. Revertant T cells showed diversity in TCRC $\beta$ 1, CD4, and CD8 expression (data not shown), suggesting that the reversion events occurred early in development.

CD69 upregulation and short-term proliferation of primary T cells after anti-CD3 antibody stimulation was impaired in the patient and reduced in carriers (Fig 2, **A** and **B**). ZAP-70 and extracellular signal-regulated kinase (ERK) phosphorylation was also impaired in CD247-deficient T cells, whereas revertant T cells displayed carrier phosphorylation levels (Fig 2, **C**). These

results indicate that the reversions could partially rescue TCR signaling *in vitro*. In contrast, the patient's T cells (both CD3 $\epsilon^{\text{low}}$  and CD3 $\epsilon^{\text{high}}$ ) readily proliferated when cultured with allogeneic cells and IL-2 (Fig 2, **D**), suggesting that their TCR signaling defect could be overcome if a long-term TCR stimulus together with continuous IL-2 supply were present. This is in line with the *in vivo* expansion of the patient's CD8<sup>+</sup> T cells being driven by chronic cytomegalovirus infection, which, in turn, would explain their exhaustion and reduced proliferative response *in vitro* compared with their CD4<sup>+</sup> counterparts. Revertant T cells were capable of expansion *in vitro* (Fig 2, **D**) and also, but less efficiently, *in vivo* (data not shown), where they did not suffice to repopulate the T-cell compartment.

The immunologic phenotype of this new patient resembled that of 2 other reported cases of CD247 deficiency (see Table E2 and Fig E4 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). In both cases, CD3 $\epsilon^{\text{low}}$  and CD3 $\epsilon^{\text{high}}$  T cells were also identified. The first study<sup>3</sup> reported 3 second-site somatic mutations in CD247 that partially rescued TCR expression but not function, as measured solely by anti-CD3–induced ZAP-70 phosphorylation. No molecular analysis for somatic mutations was reported for the second patient.<sup>4</sup> Thus, the presence of revertants along with strongly reduced surface TCR expression is pathognomonic of CD247 deficiency.<sup>5,6</sup>

The new case described here showed complete CD247 protein deficiency due to loss of the initiation codon. The disorder was

associated with strongly reduced surface TCR and multiple developmental and functional T-cell derangements, suggesting that, as observed in mice,<sup>7</sup> CD247 plays a critical role for T-cell selection in the thymus. Yet partial TCR complexes lacking CD247 can signal to some extent for selection. The somatic mutations rescued surface TCR expression as well as proximal and distal TCR-dependent signal transduction, expectedly reaching only mutation carriers' values.

In conclusion, mild lymphopenia and functional revertant somatic mosaicism should not confound the fact that CD247 deficiency is a very severe condition that requires urgent transplantation, but easy to diagnose by intracellular flow cytometry or by the surface TCR phenotype of obligate carriers.

We thank the patients, families, and clinicians; Cristina Vicario, María Luisa Jurado, and Miguel Ángel Rodríguez Granado (Regional Transfusion Center, Madrid); Pedro Roda, Patricia Castro, and José Manuel Martín Villa (Complutense University); Craig W. Reynolds (National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick); Paloma Sánchez-Mateos (Gregorio Marañón Hospital of Madrid); Aurélie Baldolli (University Hospital Caen, France); Rebecca Buckley and Joseph Roberts (Duke University); Alain Fischer (Paris Descartes University); and the Complutense Flow Cytometry and Microscopy Facility.

Ana V. Marin, MSc<sup>a</sup>  
Anaïs Jiménez-Reinoso, MSc<sup>a</sup>  
Alejandro C. Briones, MSc<sup>a</sup>  
Miguel Muñoz-Ruiz, MSc<sup>a</sup>  
Cigdem Aydogmus, MD<sup>b</sup>  
Luke J. Pasick, BSc<sup>a</sup>  
Jorge Couso, MSc<sup>a</sup>  
Marina S. Mazariegos, MSc<sup>a</sup>  
Angel F. Alvarez-Prado, MSc<sup>c</sup>  
Alfonso Blázquez-Moreno, MSc<sup>d</sup>  
Fundia E. Cipe, MD<sup>e</sup>  
Sule Haskologlu, MD<sup>e</sup>  
Figen Dogu, MD<sup>e</sup>  
Matías Morín, PhD<sup>f</sup>  
Miguel A. Moreno-Pelayo, PhD<sup>g</sup>  
Félix García-Sánchez, PhD<sup>h</sup>  
Juana Gil-Herrera, MD, PhD<sup>h</sup>  
Edgar Fernández-Malavé, PhD<sup>a</sup>  
Hugh T. Reyburn, PhD<sup>d</sup>  
Almudena R. Ramiro, PhD<sup>c</sup>  
Aydan İkinçioğullari, MD<sup>e</sup>  
Maria J. Recio, PhD<sup>a</sup>  
Jose R. Regueiro, PhD<sup>a,\*</sup>  
Beatriz Garcillán, PhD<sup>a,†,\*</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital, 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain; <sup>b</sup>the Department of Pediatric Immunology, Istanbul Kanuni Sultan Süleyman Hospital, Istanbul, Turkey; <sup>c</sup>the B cell Biology Lab, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; <sup>d</sup>the Department of Immunology and Oncology, National Centre for Biotechnology, CSIC, Madrid, Spain; <sup>e</sup>the Department of Pediatric Immunology-Allergy, Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey; <sup>f</sup>the Ramón y Cajal University Hospital, IRYCIS and CIBERER, Madrid, Spain; <sup>g</sup>the Laboratory of Histocompatibility, Regional Transfusion Center, Madrid, Spain; <sup>h</sup>the Division of Immunology, Hospital General Universitario and Health Research Institute Gregorio Marañón, Madrid, Spain; and <sup>i</sup>the Department of Microbiology and Immunology, The University of Melbourne, Melbourne, Australia. E-mail: [regueiro@ucm.es](mailto:regueiro@ucm.es).

\*These authors contributed equally to this work.

This study was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO) (grant nos. SAF2011-24235, SAF2012-32293, SAF2014-58752-R, and SAF2014-54708-R); Instituto de Salud Carlos III (grant nos. RD08-0075-0002 [RIER], PI11/00298, PI11/02198, PI12/02761, and CIBERER\_ER16P5AC7282); and Fundación Lair (grant no. 2012/0070). A.V.M. was supported by Comunidad de Madrid (S2010/BMD-2316/2326) and Complutense University (CT45/15-CT46/15), A.J.-R.

by MINECO (grant no. BES-2012-055054), A.B.-M. by MINECO (grant no. SVP-2014-068263), M.M.-R. by Complutense University, and B.G. by Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.

Disclosure of potential conflict of interest: J. R. Regueiro has received grants from Ministerio de Economía y Competitividad, Instituto de Salud Carlos III, and Fundación LAIR. J. Gil-Herrera has received a grant from Instituto de Salud Carlos III. H. T. Reyburn has received a grant from Instituto de Salud Carlos III and has consultant arrangements with MINECO. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Call ME, Pyrdol J, Wiedmann M, Wucherpfennig KW. The organizing principle in the formation of the T cell receptor-CD3 complex. *Cell* 2002;111:967-79.
2. Valés-Gómez M, Estes G, Aydogmus C, Blázquez-Moreno A, Marin AV, Briones AC, et al. NK cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient. *J Allergy Clin Immunol* 2016;137:942-5.e4.
3. Rieux-Laucat F, Hivroz C, Lim A, Mateo V, Pellier I, Selz F, et al. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N Engl J Med* 2006;354:1913-21.
4. Roberts JL, Lauritsen JP, Cooney M, Parrott RE, Sajaroff EO, Win CM, et al. T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* 2007;109:3198-206.
5. Garcillán B, Marin AV, Jiménez-Reinoso A, Briones AC, Muñoz-Ruiz M, García-León MJ, et al. Gammadelta T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies. *Front Immunol* 2015;6:20.
6. Marin AVM, Garcillán B, Jiménez-Reinoso A, Muñoz-Ruiz M, Briones AC, Fernández-Malavé E, et al. Human congenital T cell receptor disorders. *LymphoSign J* 2015;2:3-19.
7. Love PE, Shores EW, Johnson MD, Tremblay ML, Lee EJ, Grinberg A, et al. T cell development in mice that lack the zeta chain of the T cell antigen receptor complex. *Science* 1993;261:918-21.

Available online August 21, 2016.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.06.020>

## Early and late B-cell developmental impairment in nuclear factor kappa B, subunit 1-mutated common variable immunodeficiency disease

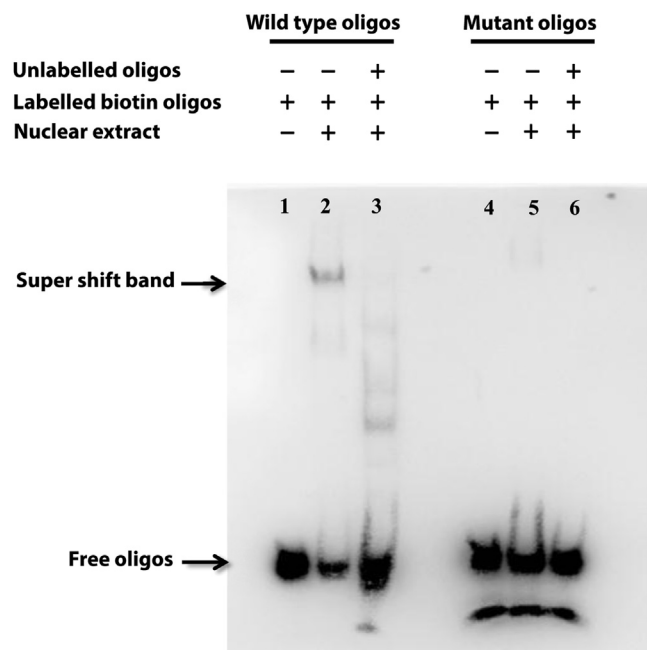


To the Editor:

The nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway plays an important role in immune cell biology.<sup>1</sup> Both the classical (nuclear factor kappa B, subunit 1 [NF-κB1]; p105/p50) and the alternative (nuclear factor kappa B, subunit 2 [NF-κB2]; p100/p52) NF-κB pathways have been largely studied mainly in animal models.<sup>1</sup> Regarding B cells, the role of NF-κB1 was underlined in a murine nf-κb1 knockout model in which peripheral B cells showed defective maturation, defective isotype switching, and impaired humoral immune responses.<sup>1-3</sup> A similar, although more pronounced, immunologic phenotype was observed in the nf-κb2 knockout mice, with defective secondary lymphoid organ development and impaired B-cell development both in early (bone marrow) and in late (periphery) stages with defective humoral responses both to T-dependent and to T-independent antigens.<sup>1</sup> The role of NF-κB2 in human B-cell development was recently defined in patients carrying monoallelic mutations in NF-κB2, leading to common variable immunodeficiency (CVID)-like disease with autoimmunity and defects in late stages of peripheral B-cell maturation.<sup>4,5</sup> Monoallelic mutations in NF-κB1 leading to p50 haploinsufficiency were recently described in a limited number of patients with CVID<sup>6</sup>; however, data regarding the effect of monoallelic NF-κB1 mutations on B-cell development are scarce. We report on 2 patients carrying monoallelic mutations in NF-κB1, one of







**FIG 2.** Electrophoretic mobility shift assay. Biotin-labeled wild-type or mutant oligonucleotides incubated without nuclear extracts (*lanes 1 and 4*), with nuclear extracts (*lanes 2, 3, 5, and 6*), and in the absence (*lanes 2 and 5*) or presence (*lanes 3 and 6*) of an excess of unlabeled oligonucleotides. A supershift DNA/protein complex band is detected and marked. The free-labeled oligonucleotide is indicated.

means of hematopoietic stem cell transplantation or gene therapy. Furthermore, our finding highlights the potential role of mutations in gene regulatory regions as a cause of significant primary immunodeficiencies.

We thank Niek P. van Til, Department of Hematology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands, for providing the wild-type gcPRO plasmid.

Anita Chandra, MRCP, FRCPATH, PhD<sup>a,b,f,\*</sup>

Fang Zhang, PhD<sup>c,\*</sup>

Kimberly C. Gilmour, FRCPATH, PhD<sup>d</sup>

David Webster, FRCPATH<sup>e</sup>

Vincent Plagnol, PhD<sup>h</sup>

Dinakantha S. Kumararatne, FRCPATH, DPhil<sup>a</sup>

Siobhan O. Burns, MB, PhD, MRCPI(Paed)<sup>e,i</sup>

Sergey Nejentsev, MD, PhD<sup>f</sup>

Adrian J. Thrasher, MRCP, PhD<sup>c,g</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Clinical Biochemistry and Immunology, Cambridge University Hospitals NHS Foundation Trust, Cambridge, United Kingdom; <sup>b</sup>Lymphocyte Signalling & Development, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom; <sup>c</sup>Molecular and Cellular Immunology, Institute of Child Health, University College London, London, United Kingdom; <sup>d</sup>the Department of Immunology, Great Ormond Street Hospital NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; <sup>e</sup>University College London Institute of Immunity and Transplantation, London, United Kingdom; <sup>f</sup>the Department of Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom; <sup>g</sup>Great Ormond Street Hospital NHS Foundation Trust, London, United Kingdom; <sup>h</sup>University College London Genetics Institute, University College London, London, United Kingdom; and <sup>i</sup>the Department of Immunology, Royal Free London NHS Foundation Trust, London, United Kingdom. E-mail: [anita.chandra@doctors.org.uk](mailto:anita.chandra@doctors.org.uk).

\*These authors contributed equally to this work.

S.N. is a Wellcome Trust Senior Research Fellow in Basic Biomedical Science (095198/Z/10/Z). S.N. is also supported by the European Research Council Starting grant 260477 and the EU FP7 collaborative grant 261441 (PEVNET project) and a National Institute for Health Research (NIHR) Cambridge Biomedical Research Centre. F.Z. is

funded by an EU FP7 grant: CELL-PID—Advanced Cell-based therapies for the treatment of primary immunodeficiencies (reference no. FP7-261387). A.C. has a Wellcome Trust Postdoctoral Training Fellowship for Clinicians (103413/Z/13/Z). A.J.T. is a Wellcome Trust Principal Fellow.

Disclosure of potential conflict of interest: A. Chandra and D. S. Kumararatne received travel support from Shire. S. O. Burns received travel support from Immunodeficiency Canada, CSL Behring, and Baxter US. The rest of the authors declare that have no relevant conflicts of interest.

## REFERENCES

- Modell V, Gee B, Lewis DB, Orange JS, Roifman CM, Routes JM, et al. Global study of primary immunodeficiency diseases (PI)—diagnosis, treatment, and economic impact: an updated report from the Jeffrey Modell Foundation. *Immunol Res* 2011;51:61-70.
- Puck JM, Pepper AE, Henthorn PS, Candotti F, Isakov J, Whitman T, et al. Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Blood* 1997;89:1968-77.
- Ochs HD. Common variable immunodeficiency (CVID): new genetic insight and unanswered questions. *Clin Exp Immunol* 2014;178(suppl 1):5-6.
- Markiewicz S, Bosselut R, Le Deist F, de Villartay JP, Hivroz C, Ghysdahl J, et al. Tissue-specific activity of the gamma chain promoter depends upon an Ets binding site and is regulated by GA-binding protein. *J Biol Chem* 1996;271:14849-55.
- Niemela JE, Puck JM, Fischer RE, Fleischer TA, Hsu AP. Efficient detection of thirty-seven new IL2RG mutations in human X-linked severe combined immunodeficiency. *Clin Immunol* 2000;95:33-8.
- Estévez OA, Ortega C, Fernández S, Aguado R, Rumbao J, Perez-Navarro J, et al. A novel IL2RG mutation presenting with atypical T(-)B(+)NK+ phenotype: rapid elucidation of NK cell origin. *Paediatr Blood Cancer* 2014;61:178-9.
- Kellermayer R, Hsu AP, Stankovic J, Balogh P, Hadzisevic K, Vojcek A, et al. A novel IL2RG mutation associated with maternal T lymphocyte engraftment in a patient with severe combined immunodeficiency. *J Hum Genet* 2006;51:495-7.
- Sharrocks AD. The ETS-domain transcription factor family. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:827-37.
- Ciau-Uitz A, Wang L, Patient R, Liu F. ETS transcription factors in haematopoietic stem cell development. *Blood Cell Mol Dis* 2013;51:248-55.

Available online October 31, 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.049>

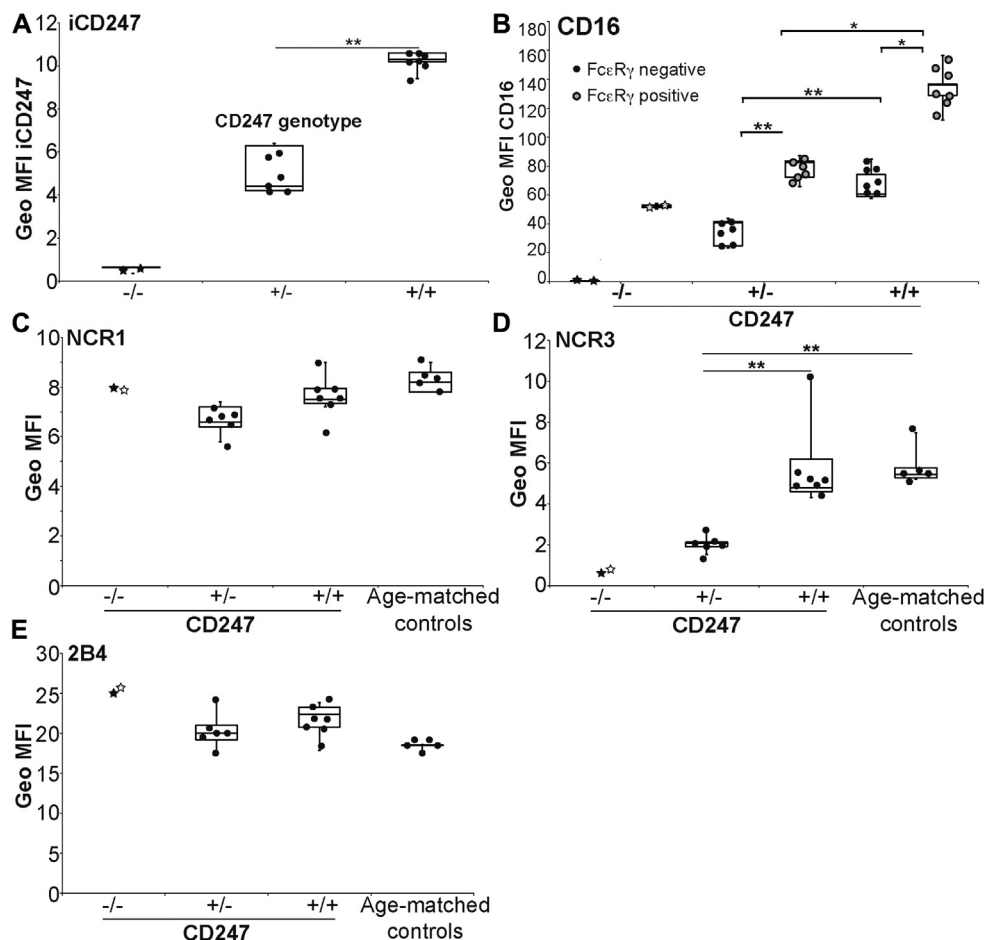
## Natural killer cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient



### To the Editor:

The analysis of single gene defects in patients with primary immunodeficiency has provided important insights into the normal physiology of the immune system and is particularly valuable in those instances where the human and murine immune systems are different.<sup>1</sup> CD247 (T-cell receptor [TCR]  $\zeta$ /CD3 $\zeta$ ) is one of the invariant chains that, along with CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , CD3 $\epsilon$ , and a clonotypic TCR heterodimer ( $\alpha\beta$  or  $\gamma\delta$ ), forms the TCR antigen receptor complex expressed at the surfaces of T lymphocytes. However, CD247 is also expressed in natural killer (NK) cells, and although the biology of CD247 in the TCR complex is similar in mice and human subjects, there are marked differences between human and murine NK cells in the expression and association of activating NK receptors (CD16/Fc $\gamma$ RIII, natural cytotoxicity receptor (NCR)3/NKp30, and NCR1/NKp46) with CD247.<sup>2,3</sup> Thus analysis of the rare patients deficient in CD247 provides unique insights into the biology of this signaling molecule in NK cells that cannot be obtained from the study of murine models.

Two CD247-deficient patients have been described previously.<sup>4,5</sup> Those studies focused on the effects of this deficiency on T cells, and although a somewhat reduced NK cell activity was noted, this population was not studied in detail. Here we report in-depth analyses of NK cells in a new case of inherited



**FIG 1.** CD247 genotype correlates with expression of CD247 and CD16 and NCR3 expression on NK cells. NK receptor expression levels in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells from the CD247<sup>-/-</sup> patient were compared with those of CD247<sup>+/-</sup> and CD247<sup>+/+</sup> relatives or age-matched control subjects for intracellular CD247 (A), CD16 on FcεRγ<sup>+</sup> or FcεRγ<sup>-</sup> cells (B), NCR1 (C), NCR3 (D), and 2B4 (E). Data are shown as geometric mean fluorescence intensity (Geo MFI). ★/☆, First/second sample taken 3 months apart \**P* < .05 and \*\**P* < .01.

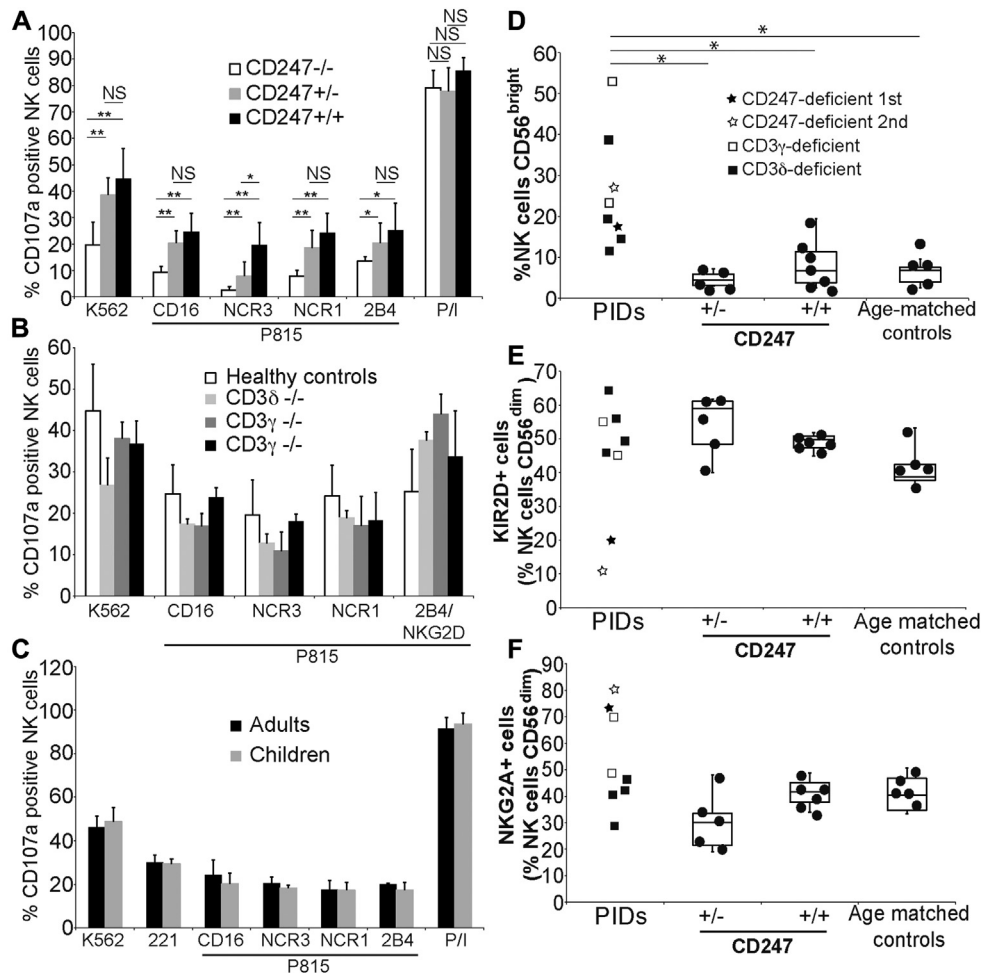
CD247 deficiency (see the [Case report](#) in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)) because of loss of the translation initiation codon (see [Fig E1, A](#), in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)). NK cells from other family members, who were either heterozygous for the mutation in CD247 or homozygous for wild-type CD247 (see [Fig E1, B](#)), were also analyzed.

Loss of the initiation codon led to the complete absence of CD247 protein expression in the proband (see [Fig E1, C](#)), and correlation between levels of CD247 expression in CD3<sup>+</sup>CD56<sup>dim</sup> NK cells and genotype was observed in family members ([Fig 1, A](#)). In human NK cells the CD16, NCR1/NKp46, and NCR3/NKp30 receptors associate with CD247 or FcεRγ.<sup>3</sup> The level of surface CD16 on NK cells, both FcεRγ<sup>-</sup> and FcεRγ<sup>+</sup>, segregated with the CD247 genotype of the donor ([Fig 1, B](#), and see [Fig E2, A](#), in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), strongly suggesting that the defective expression of CD247 underlies these phenotypic changes.

In contrast, NCR1, but not NCR3, expression in NK cells was comparable in all genotypes ([Fig 1, C and D](#), and see [Fig E2, B](#)), suggesting that association with FcεRγ is sufficient for surface expression of NCR1, even in the absence of CD247, whereas

NCR3 expression depends principally on CD247. Finally, as expected, surface expression of the 2B4 receptor, which is not known to associate with CD247, was normal in all subjects, irrespective of the CD247 genotype ([Fig 1, E](#)).

To gain insight into the functional effect of CD247 deficiency on NK cell function, we analyzed degranulation of IL-2-cultured NK cells from the patient and her relatives in response to receptor-mediated signals (shown in [Fig 1](#)) by using either specific mAb and P815 cells or K562 cells as targets ([Fig 2, A](#)). IL-2-cultured NK cells were used for these experiments because NK cell cytotoxicity is greatly reduced compared with that seen in adults in early life; however, exposure to IL-2 can reconstitute NK cell cytotoxic capacity to adult levels,<sup>6</sup> thus permitting a fair comparison of NK cell cytotoxic function from the infant patient and adult family members. The patient's NK cells responded poorly to all receptor-mediated signals, irrespective of their surface expression levels ([Fig 2, A](#)). However, the patient's NK cells did not have a general defect in cytotoxic machinery because their receptor-independent degranulation induced by phorbol 12-myristate 13-acetate plus ionomycin was normal. Although NK cell degranulation from CD247<sup>+/-</sup> subjects was always somewhat less than that observed for CD247<sup>+/+</sup> control subjects,



**FIG 2.** Hyporesponsiveness (A-C) and impaired maturation (D-F) of CD247-deficient NK cells. Comparative degranulation in response to the indicated stimuli for the 3 CD247 genotypes (Fig 2, A), CD3 $\delta$ - and CD3 $\gamma$ -deficient patients versus healthy control subjects (Fig 2, B), and healthy adults versus children (Fig 2, C). CD3-deficient (*squares*) and CD247-deficient primary immunodeficiencies were compared among them and with CD247<sup>+/-</sup> and CD247<sup>+/+</sup> relatives or age-matched control subjects for peripheral blood CD56<sup>bright</sup> NK cells (Fig 2, D), KIR2D+CD56<sup>dim</sup> NK cells (Fig 2, E), and CD94/NKG2A+CD56<sup>dim</sup> NK cells (Fig 2, F). ★/☆, First/second sample. \**P* < .05 and \*\**P* < .01.

these differences only reached statistical significance for stimulation through NCR3 (Fig 2, A), again suggesting that CD247 is particularly important for NCR3 expression and signaling.

The observed receptor-mediated NK cell hyporesponsiveness was specific for CD247 deficiency because it was not seen for NK cells from patients with CD3 $\gamma$  or CD3 $\delta$  deficiencies (Fig 2, B) and was unrelated to age (Fig 2, C).

Given the hyporesponsiveness of NK cells from the CD247-deficient patient, her NK cell differentiation was compared with that of other family members and age-matched control subjects. Peripheral blood NK cells can be divided into 2 subsets: CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> cells. CD56<sup>bright</sup> NK cells produce cytokines after monokine stimulation and are considered progenitors of the CD56<sup>dim</sup> NK cells, which are more specialized for cytotoxicity.<sup>7</sup> Although the total number of CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> NK cells was comparable in the CD247-deficient patient and other family members and control subjects (data not shown), the proportion of CD56<sup>bright</sup> NK cells was considerably higher

(Fig 2, D), suggesting defective NK cell differentiation. Consistent with this hypothesis, flow cytometric analysis of expression of additional surface markers in the CD56<sup>dim</sup> NK cell subset also revealed impaired NK cell maturation in the patient. In particular, late stages of the differentiation of CD56<sup>dim</sup> NK cells are characterized by a switch from CD94/NKG2A expression to killer immunoglobulin-like receptor (KIR) expression.<sup>7</sup> As expected, the majority of CD56<sup>dim</sup> NK cells from control subjects expressed KIR2D receptors, as did NK cells from patients with CD3 $\gamma$  or CD3 $\delta$  deficiencies. However, only approximately 20% of CD56<sup>dim</sup> NK cells from the CD247-deficient patient expressed KIR2D (Fig 2, E), whereas greater than 80% of these cells expressed the CD94/NKG2A heterodimer (Fig 2, F), demonstrating a specific block in the late differentiation stages of CD56<sup>dim</sup> NK cells in this patient.

Our data suggest that CD247 deficiency affects NK cell development and function both directly and indirectly. In particular, an increased proportion of peripheral blood CD56<sup>bright</sup> NK cells was noted in all CD3/CD247-deficient patients

examined, suggesting that the absence of functional T cells, rather than specifically CD247, affects NK differentiation. This observation is consistent with data from patients undergoing stem cell transplantation (SCT) in whom the first NK cells to repopulate the periphery have an immature phenotype and are less able to mediate cytotoxicity before T-cell recovery.<sup>8</sup> Interestingly, the ability of peripheral blood NK cells from the CD247-deficient patient to proliferate in mixed lymphocyte cultures *in vitro* was severely limited (see Fig E3 in this article's Online Repository at [www.jacionline.org](http://www.jacionline.org)), but this phenotype could be reversed by IL-2 addition.

During differentiation, the ability of NK cells to respond to stimulation is finely tuned in function of the repertoire of inhibitory and activating receptors expressed by each NK cell.<sup>9</sup> Because CD247 deficiency causes decreased expression and function of a range of activating NK receptors, impaired signaling might underlie the partial block of NK cell differentiation and NK cell hyporesponsiveness, which were observed in the CD247-deficient patient. Importantly, similar changes in NK cell phenotype and function have not been seen in children with symptomatic congenital human cytomegalovirus (CMV) infection,<sup>10</sup> arguing against the hypothesis that the changes observed in the CD247-deficient patient are a consequence of CMV infection.

Our observations have direct implications for the clinical management of immunodeficient patients. Even when not directly fatal, episodes of infectious disease delay transplantation and negatively affect the outcome. Thus, because NK cells play a critical role in antiviral immunity, the potentiation of NK cell function, for example by means of low-dose therapy with IL-2, could be a useful strategy to minimize infections and aid in the management of these patients until SCT.

We thank all of the subjects who have contributed blood samples for these studies and Drs M. Lopez-Botet, J. Gil-Herrera, and M. L. Toribio for helpful discussion and advice.

Mar Valés-Gómez, PhD<sup>a\*</sup>  
Gloria Estes, PhD<sup>a\*</sup>  
Cigdem Aydogmus, MD<sup>b</sup>  
Alfonso Blázquez-Moreno, BSc<sup>c</sup>  
Ana V. Marín, BSc<sup>c</sup>  
Alejandro C. Briones, BSc<sup>c</sup>  
Beatriz Garcillán, PhD<sup>c</sup>  
Eva-María García-Cuesta, BSc<sup>a</sup>  
Sheila López Cobo, BSc<sup>a</sup>  
Sule Haskologlu, MD<sup>d</sup>  
Manuela Moraru, MD<sup>e</sup>  
Funda Cipe, MD<sup>b</sup>  
Kerry Dobbs, BS<sup>f</sup>  
Figen Dogu, MD<sup>d</sup>  
Silvia Parolini, PhD<sup>g</sup>  
Luigi D. Notarangelo, MD<sup>f</sup>  
Carlos Vilches, MD, PhD<sup>e</sup>  
Maria J. Recio, PhD<sup>c</sup>  
José R. Regueiro, PhD<sup>c</sup>  
Aydan Ikinciogullari, MD<sup>d</sup>  
Hugh T. Reyburn, PhD<sup>e</sup>

From <sup>a</sup>the Department of Immunology and Oncology, National Centre for Biotechnology, CSIC, Madrid, Spain; <sup>b</sup>the Department of Pediatric Immunology, Istanbul Kanuni Sultan Süleyman Hospital, Istanbul, Turkey; <sup>c</sup>the Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain; <sup>d</sup>the Department of Pediatric Immunology-Allergy, Ankara University School of Medicine, Ankara, Turkey; <sup>e</sup>Immunogenetics-HLA,

Instituto de Investigación Sanitaria Puerta de Hierro, Madrid, Spain; <sup>f</sup>the Division of Immunology, Boston Children's Hospital, Boston, Mass; and <sup>g</sup>the Department of Molecular and Translational Medicine, University of Brescia, Brescia, Italy. E-mail: [mvalés@cnb.csic.es](mailto:mvalés@cnb.csic.es). Or: [hreyburn@cnb.csic.es](mailto:hreyburn@cnb.csic.es).

\*These authors contributed equally to this work.

Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria (PI11/00298, PS09/00181, FIS2011-00127 and PI08/1701), MINECO (SAF2011-24235, SAF2012-32293, SAF2010-22153-C03-03, SAF2014-54708-R and SAF2014-58752-R), the Comunidad de Madrid (grant S2010/BMD-2326 to M.V.-G. and S2010/BMD-2316 to J.R.R.), and the National Institutes of Health (grant 5R01AI100887-03 to L.D.N.).

Disclosure of potential conflict of interest: M. Vales-Gomez has received research support from the Regional Government of Madrid, MINECO, and Instituto Carlos III. A. C. Briones, B. Garcillán, E. -M. García-Cuesta, S. Lopez-Cobo, M. J. Recio, and J. R. Regueiro have received research support and travel support from the Spanish Ministerio de economía y competitividad (MINECO). G. Estes, A. Blázquez-Moreno, and H. T. Reyburn have received research support from Instituto Carlos III and MINECO. A. V. Marín, M. Moraru, and C. Vilches have received research support from MINECO. L. D. Notarangelo has received research support from the National Institutes of Health (NIH) and the March of Dimes; is a board member for the *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, the *Journal of Clinical Immunology*, and *Novimmune*; is employed by Boston Children's Hospital Pediatric Associates; and has received royalties from UpToDate. The rest of the authors declare that they have no relevant conflicts of interest.

## REFERENCES

1. Casanova JL, Conley ME, Seligman SJ, Abel L, Notarangelo LD. Guidelines for genetic studies in single patients: lessons from primary immunodeficiencies. *J Exp Med* 2014;211:2137-49.
2. Hollyoake M, Campbell RD, Aguado B. NKp30 (NCR3) is a pseudogene in 12 inbred and wild mouse strains, but an expressed gene in *Mus caroli*. *Mol Biol Evol* 2005;22:1661-72.
3. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008;9:495-502.
4. Rieux-Laucat F, Hivroz C, Lim A, Mateo V, Pellier I, Selz F, et al. Inherited and somatic CD3zeta mutations in a patient with T-cell deficiency. *N Engl J Med* 2006;354:1913-21.
5. Roberts JL, Lauritsen JP, Cooney M, Parrott RE, Sajaroff EO, Win CM, et al. T-B+NK+ severe combined immunodeficiency caused by complete deficiency of the CD3zeta subunit of the T-cell antigen receptor complex. *Blood* 2007;109:3198-206.
6. Guilmot A, Hermann E, Braud VM, Carlier Y, Truysens C. Natural killer cell responses to infections in early life. *J Innate Immun* 2011;3:280-8.
7. Luetke-Eversloh M, Killig M, Romagnani C. Signatures of human NK cell development and terminal differentiation. *Front Immunol* 2013;4:499.
8. Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jikali A, Rouas-Freiss N, et al. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood* 2005;105:4135-42.
9. Shifrin N, Raulet DH, Ardolino M. NK cell self tolerance, responsiveness and missing self recognition. *Semin Immunol* 2014;26:138-44.
10. Noyola DE, Fortuny C, Muntassell A, Noguera-Julian A, Munoz-Almagro C, Alarcon A, et al. Influence of congenital human cytomegalovirus infection and the NKG2C genotype on NK-cell subset distribution in children. *Eur J Immunol* 2012;42:3256-66.

Available online November 2, 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2015.07.051>

**Anti-IFN-γ autoantibodies are strongly associated with HLA-DR\*15:02/16:02 and HLA-DQ\*05:01/05:02 across Southeast Asia**



To the Editor:

Neutralizing anti-IFN-γ autoantibodies (nAIGAs) are a recently recognized mechanism of infection with disseminated nontuberculous mycobacteria and other intracellular opportunists, with the phenotype being similar to genetic disruption of IFN-γ immunity.<sup>1-3</sup> In the last decade, there has been a high prevalence of nAIGAs, nearly completely restricted to patients from Southeast Asia, mostly from Thailand and Taiwan,<sup>4,5</sup>





# $\gamma\delta$ T lymphocytes in the diagnosis of human T cell receptor immunodeficiencies

Beatriz Garcillán<sup>1†</sup>, Ana V. M. Marin<sup>1†</sup>, Anaïs Jiménez-Reinoso<sup>1</sup>, Alejandro C. Briones<sup>1</sup>, Miguel Muñoz-Ruiz<sup>1</sup>, María J. García-León<sup>2</sup>, Juana Gil<sup>3</sup>, Luis M. Allende<sup>4</sup>, Eduardo Martínez-Naves<sup>1</sup>, María L. Toribio<sup>2</sup> and José R. Regueiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Immunology, Complutense University School of Medicine and Hospital 12 de Octubre Health Research Institute, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas and Universidad Autónoma, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Division of Immunology, Hospital General Universitario, Gregorio Marañón and Health Research Institute, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Division of Immunology, Hospital Universitario 12 de Octubre and Health Research Institute, Madrid, Spain

\*Correspondence: regueiro@med.ucm.es

<sup>†</sup>Joint first authors.

## Edited by:

Julie Dechanet-Merville, Centre National de la Recherche Scientifique, France

## Reviewed by:

Sylvain Latour, Centre National de la Recherche Scientifique, France

Paul Fisch, University Freiburg Medical Center, Germany

**Keywords:** TCR, immunodeficiency, diagnosis,  $\gamma\delta$ , T lymphocyte

## INTRODUCTION

Human T cell receptor (TCR) immunodeficiencies (TCRID) are rare autosomal recessive disorders caused by mutations affecting TCR, CD3, or CD247 chains, which share developmental, functional, and TCR expression defects (1). Their rapid diagnosis is fundamental for patient survival and early hematopoietic stem cell transplantation. Here, we propose that studying  $\gamma\delta$  T cells, which are often neglected, can be helpful for a timely diagnosis. We thus offer a diagnostic flowchart and some lab tricks based on published cases.

## $\gamma\delta$ T CELL AND TCR PHYSIOPATHOLOGY

$\gamma\delta$  T lymphocytes are a minor subset (1–10%) of human peripheral blood T cells. Most (>70%) are CD4<sup>−</sup>CD8<sup>−</sup> [double negative (DN)], some (30%) are CD8<sup>+</sup>CD4<sup>−</sup> and very few (<1%) are CD4<sup>+</sup>CD8<sup>−</sup> [CD8<sup>+</sup> or CD4<sup>+</sup> single positive (SP), respectively]. Most  $\gamma\delta$  T cells in adults express V $\delta$ 2/V $\gamma$ 9 TCR variable regions (65–90%), the rest being mostly V $\delta$ 1<sup>+</sup>, some V $\delta$ 3<sup>+</sup> or V $\delta$ 5<sup>+</sup>, all with different V $\gamma$  chains (2). As peripheral blood  $\gamma\delta$  T cells are scarce, their over-representation is more conspicuous than their under-representation, which is very rarely reported and normally associated to a single subset, such as V $\delta$ 2<sup>+</sup> in

granulomatosis (3) or aging (4). Indeed, no selective  $\gamma\delta$  T cell immunodeficiency (ID) has been reported to date, although absence of  $\gamma\delta$  T cells has been described together with other lymphocyte derangements in rare primary ID (5). The clinical significance of increased  $\gamma\delta$  T cells, defined as >10% of peripheral blood T lymphocytes (6), requires clarification in several diseases including infection, autoimmunity, cancer, and primary ID.

The human  $\gamma\delta$ TCR (Figure 1A inset) is an octameric protein complex composed of three heterodimers (TCR $\gamma$ /TCR $\delta$ , CD3 $\gamma$ /CD3 $\epsilon$ , and CD3 $\delta$ /CD3 $\epsilon$ ) and a single CD247 homodimer (also termed  $\zeta/\zeta$ ). The complex can be abbreviated as  $\gamma\delta$ TCR/ $\gamma\epsilon\delta\epsilon\zeta\zeta$ . The TCR $\gamma$ /TCR $\delta$  heterodimer contains variable regions, which allow for antigen recognition, while the other three dimers are invariant and are required for surface TCR expression and for intracellular propagation of the recognition signal (7). Therefore, defects in any chain would expectedly impact  $\gamma\delta$ TCR expression and  $\gamma\delta$  T cell selection and function.

## $\gamma\delta$ T CELLS IN TCRID

$\alpha\beta$  T cells have been extensively studied in TCRID. In contrast,  $\gamma\delta$  T cells have been frequently ignored, in part due to their scarcity but also to the lack of markers

other than the TCR to identify them when TCR expression is reduced, as is the case in TCRID. Although their functions are still debated, we believe that their accurate study (relative numbers, Figure 1A, TCR expression, Figure 1B, and main subsets) can help to diagnose TCRID, as reviewed below and summarized in a practical diagnostic flowchart in Figure 1C.

TCR $\alpha$  deficient patients showed combined ID and autoimmune features due to a selective block in  $\alpha\beta$  T cell development, as TCR $\alpha$  is part of the TCR $\alpha$ /TCR $\beta$  ( $\alpha\beta$ TCR, Figure 1A inset) antigen-binding heterodimer (9). In contrast, the  $\gamma\delta$ TCR was unaffected, as demonstrated by normal surface expression (Figure 1B), which allowed for normal absolute but increased relative numbers of  $\gamma\delta$  T cells (Figure 1A). This is unique among TCRID and thus a useful feature in the diagnostic flowchart (Figure 1C). Such  $\gamma\delta$  T cells were proposed to be in part protective from infections in the two reported patients. Indeed,  $\gamma\delta$  T cells are involved in immune responses against a variety of pathogens including virus, bacteria, and parasites, whereas still other act as antigen-presenting cells (10) or B cell helper cells (11). Their beneficial effects *in vivo* have found recent unexpected recognition in haploidentical allogeneic hematopoietic cell transplantation after depletion of  $\alpha\beta$  T and B cells (12),

**Abbreviations:** DN, double negative; DP, double positive; ID, immunodeficiency; mAb, monoclonal antibody; SCID, severe combined immunodeficiency; SP, single positive; TCR, T cell receptor; TCRID, T cell receptor immunodeficiencies.

TESIS DOCTORAL  
MADRID, 2019.